

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Kata Šipić

Mikrobiološke i enzimatske metode uklanjanja  
herbicida iz voda

**ZAVRŠNI RAD**

Voditelj rada: izv. prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

Članovi ispitnog povjerenstva:

izv. prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

izv. prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac

prof. dr. sc. Đurđa Vasić-Rački

Zagreb, rujan 2015.

*Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Zvezdani Findrik Blažević na ukazanom strpljenu, uloženom trudu i pomoći prilikom pisanja ovog završnog rada.*

*Također se zahvaljujem svojim roditeljima na podršci.*

## SAŽETAK

U radu su opisane mikrobiološke te enzimatske metode uklanjanja bentazona, pendimetalina i terbutilazina. Odabrani herbicidi nalaze se u tri različite kemijske skupine jer se razlikuju po mehanizmu djelovanja. Bentazon se ubraja u benzotiadiazinone, pendimetalin u dinitroaniline, a terbutilazin u triazine. Benzotiadiazinoni i triazini inhibitori su fotosinteze, dok su dinitroanilini inhibitori diobe biljnih stanica. Razgradnja terbutilazina u tlu ovisi i o temperaturi te se brže razgrađuje na višim temperaturama. Uklanjanje pendimetalina iz vode moguće je korištenjem bakterija koje imaju sposobnost razgradnje tog herbicida. Kao postupak razgradnje u literaturi spominje se bioremedijacija koja djeluje kao prirodni proces mikrobiološke razgradnje odnosno kao interakcija mikroorganizama i sastojaka otpada, primjenom bioreaktora te tzv. „zelena tehnologija“ koja podrazumijeva biljke kao faktore razgradnje različitih onečišćujućih tvari. Postupci uklanjanja provode se kako bi se smanjio utjecaj na zdravlje ljudi te sačuvao prirodni okoliš.

*Ključne riječi:* bentazon, terbutilazin, pendimetalin, mikrobiološke metode, enzimatske metode

## **ABSTRACT**

This paper describes the microbiological and enzymatic methods for removing bentazone, pendimethalin and terbutylazine. Selected herbicides are divided in three different chemical groups differing in the mechanism of action. Bentazon is included in the benzothiadiazinones, pendimethalin in the dinitroaniline and terbutylazine in the benzothiadiazinones. Benzothiadiazinones and triazines are inhibitors of photosynthesis while dinitroanilines are inhibitors of plant cell division. Terbutylazine degradation in the soil also depends on the temperature and is quickly degraded at higher temperatures. Pendimethalin can be removed from water using bacteria that have the ability of herbicide degradation. As a process of degradation bioremediation is mentioned, this acts as a natural process of microbial degradation or by the interaction of microorganisms and components of waste, by using a bioreactor. Removal processes are carried out in order to reduce the impact on human health and preserve the natural environment.

*Keywords:* bentazone, terbutylazine, pendimethalin, microbiological methods, enzymatic methods

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OPĆI DIO.....</b>	<b>2</b>
2.1 KOROVI.....	2
2.2 HERBICIDI .....	3
2.2.1 BENTAZON ( $C_{10}H_{12}N_2O_3S$ ).....	4
2.2.2 PENDIMETALIN ( $C_{13}H_{19}N_3O_4$ ).....	5
2.2.3 TERBUTILAZIN ( $C_9H_{16}ClN_6$ ) .....	5
2.3 MEHANIZAM DJELOVANJA HERBICIDA .....	6
2.4 PERZISTENTNOST HERBICIDA.....	8
2.5 GUBICI HERBICIDA .....	9
2.6 UTJECAJ PESTICIDA NA ZDRAVLJE LJUDI .....	10
2.7 ENZIMI KAO BIOKATALIZATORI .....	12
2.8 BIOKATALIZATORI U INDUSTRIJI .....	15
2.9 KOFAKTOR.....	15
2.10 BIOREMEDIJACIJA .....	16
2.11 FITOREMEDIJACIJA .....	19
<b>3. PREGLEDNI DIO .....</b>	<b>20</b>
3.1 METODE UKLANJANJA BENTAZONA IZ VODE .....	22
3.2 METODE UKLANJANJA TERBUTILAZINA IZ VODE .....	29
3.3 METODE UKLANJANJA PENDIMETALINA IZ VODE .....	32
<b>4. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>35</b>
<b>5. LITERATURA .....</b>	<b>36</b>
<b>ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>46</b>

## 1. UVOD

Osnovni nedostatak sredstava za zaštitu bilja (herbicida) je njihov negativan utjecaj na okoliš. Posljednjih desetljeća sve se veća pažnja usmjerava na negativan utjecaj pesticida na kakvoću voda i to naročito vode za piće. Znatno veći utjecaj na kakvoću voda imaju indirektna onečišćenja voda do kojih dolazi ispiranjem kroz profil tla do podzemnih voda (Ostojić, 2003b).

Provodi se monitoring sukladno Zakonu o vodama (NN 153/09) te Uredbi o standardu kakvoće vode (NN 73/2013) gdje se prate stanja površinskih, priobalnih te podzemnih voda, kao i aktivnih tvari od kojih je većina zabranjena za primjenu. Aktivne tvari se zabranjuju ako neki od njihovih utjecaja na ljude, životinje i okoliš nije dovoljno istražen ili ako se na temelju istraženih utjecaja može zaključiti da postoji neprihvatljiv rizik za zdravlje ljudi, vodene organizme, ptice i sisavce, te ako postoji velik rizik od onečišćenja podzemnih voda. Vode su u ekološkom smislu najopterećenije i najugroženije, ali ujedno i najvažniji dio globalnog ekosustava. Poduzima se niz mjera i postupaka kojima se vode nastoji zaštititi od daljnjeg onečišćenja te poboljšati sadašnje nepovoljno stanje (Megharaj et al., 2011). Kako bi se snizile koncentracije onečišćujućih tvari do granica koje su zakonom predviđene ili koje ne predstavljaju opasnost za zdravlje ljudi i okoliš, provodi se remedijacija zemljišta i podzemnih voda. Biokatalizatori u mikroorganizmima mogu katalizirati odgovarajuće procese za uklanjanje onečišćujućih i postojećih organskih tvari iz voda.

Razgradnja pesticida mikroorganizmima, odnosno njihovim enzimima, smatra se učinkovitim i jeftinim načinom uklanjanja pesticida iz tla i vode. Tako se postupci bioremedijacije primjenjuju u posljednja dva desetljeća (Jauregui et al., 2003), bilo da se radi o *ex situ* ili *in situ* postupcima. Kao najčešći sustav za pročišćavanje voda koristi se *ex situ* postupak u bioreaktoru u kojem onečišćena voda dolazi u kontakt s podlogom koloniziranom s mikroorganizmima.

## 2. OPĆI DIO

### 2.1 KOROVI

Korovi su biljke koje rastu na površinama gdje nisu poželjne, a može se podijeliti na:

- 1) Apsolutni korov - sve biljke koje nisu predmet uzgoja i nalaze se u kompeticijskom odnosu te mogu biti štetne za sam usjev.
- 2) Relativni korov - svaka biljna vrsta na proizvodnoj površini koja nije cilj proizvodnje (npr. pšenica u suncokretu).

Korovi su štetni obzirom da uzimaju vodu, svjetlost, prostor i hranu od poljoprivrednih usjeva. Potencijalni se gubitak prinosa procjenjuje na 34% (Oerke, 2006). Ekonomski gubici procjenjuju se u milijardama dolara, što zbog sniženoga prinosa, te dodatnih troškova kao što su primjena herbicida, troškovi mehaničkog suzbijanja i slično (Yandoc-Ables et al., 2006). Korovi otežavaju obradu, žetvu ili berbu, poskupljuju proizvodnju (čišćenje sjemena, dopunska agrotehnika), domaćini su štetnim kukcima, različitim biljnim patogenima te izvor inokuluma za potencijalne zaraze kultiviranih biljaka. Ujedno smanjuju kakvoću priroda i poljoprivrednih proizvoda. Ozbiljan su ekološki problem, obzirom da su invazivne korovne vrste sposobne mijenjati ekosustave i potisnuti autohtone biljne vrste (Randall, 1996).

Korovne biljke mogu se podijeliti na dvije osnovne skupine (Kojić et al., 1972):

- 1) korovne biljke u užem smislu (skupina biljaka koje su svojom biologijom i ekologijom najbolje prilagođene razvojnem ciklusu pojedinih kulturnih biljaka) i
- 2) korovne biljke u širem smislu (nekorisne i štetne biljne vrste koje se pojavljuju na antropogenim staništima te izvan oraničnih površina).

Kemijske mjere suzbijanja korova podrazumjevaju primjenu herbicida. Kako bi bilo moguće što točnije odrediti treba li provoditi mjere suzbijanja korova i kakav će ekonomski učinak one imati, nužno je uzeti u obzir više kriterija kojima se određuje štetna prisutnost.

## 2.2 HERBICIDI

Herbicidi su kemijski spojevi namijenjeni za suzbijanje rasta i razvoja nepoželjnih biljaka (korova). Dijelimo ih u dvije glavne skupine: selektivni i neselektivni.

### 1) Selektivni herbicidi se koriste:

- za poljoprivredne površine (na kojima su zasađene ili posijane određene poljoprivredne kulture),
- ne štete zasađenoj poljoprivrednoj kulturi već samo neželjenim biljkama, tj. korovu ([http://www.syngenta.com/country/hr/cr/Syngentin\\_program/Sredstva\\_za\\_zastitu\\_bilja/Herbicidi/Pages/home.aspx](http://www.syngenta.com/country/hr/cr/Syngentin_program/Sredstva_za_zastitu_bilja/Herbicidi/Pages/home.aspx))
- za tretiranje širokolisnih i uskolisnih biljaka ([http://pinova.hr/hr\\_HR/katalog-proizvoda/sredstva-za-zastitu-bilja/herbicidi](http://pinova.hr/hr_HR/katalog-proizvoda/sredstva-za-zastitu-bilja/herbicidi)),
- zahtijevaju manje vremena za primjenu, te su jeftini.

### 2) Neselektivni herbicidi se koriste:

- za uništavanje svih vrsta biljaka s kojima dođu u kontakt ([http://www.syngenta.com/country/hr/cr/Syngentin\\_program/Sredstva\\_za\\_zastitu\\_bilja/Herbicidi/Pages/home.aspx](http://www.syngenta.com/country/hr/cr/Syngentin_program/Sredstva_za_zastitu_bilja/Herbicidi/Pages/home.aspx)), uz iznimku genetski modificiranih biljaka koje mogu biti otporne na tretiranje s neselektivnim pesticidima primjerice genetski modificiran hibrid kukuruza DK493RR, koji je otporan na glifosat (Vinceković, 2004).

Po načinu primjene, ove dvije vrste herbicida, se dijele na:

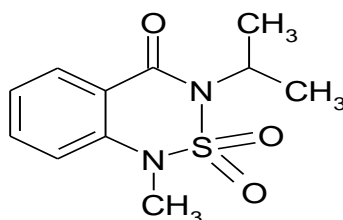
1) *Kontaktne herbicide* koji djeluju na tretiranu biljku, odnosno površinu pod biljkama, pri čemu oštećuju biljne organe te biljka uvene. Djeluju vrlo brzo te su otporni na ispiranje kišom.

2) *Sistemične herbicide* koje biljka upija putem lista ili korijena te ih prenosi kapilarama do svih dijelova biljke. Primjenjuju se za suzbijanje korova s jakim korijenom, nešto su sporijeg djelovanja, jer je potrebno duže vrijeme da se herbicid proširi u tijelu biljke ([http://www.syngenta.com/country/hr/cr/Syngentin\\_program/Sredstva\\_za\\_zastitu\\_bilja/Herbicidi/Pages/home.aspx](http://www.syngenta.com/country/hr/cr/Syngentin_program/Sredstva_za_zastitu_bilja/Herbicidi/Pages/home.aspx)).



Herbicidi općenito iskorištavaju specifične značajke biljnih organizama poput fotosinteze, biljnih hormona, aminokiselina, staničnog metabolizma i dr. Herbicidi su obično manje toksični za ostala živa bića. Osim herbicida kemijskog podrijetla postoje i tzv. bioherbicidi koji se sastoje od organizama koji su nametnici na biljkama te dovode do uvenuća korova. Ti organizmi su bakterije, gljivice, virusi, ali mogu biti i insekti (Bolognesi i Merlo, 2011).

### 2.2.1 BENTAZON ( $C_{10}H_{12}N_2O_3S$ )

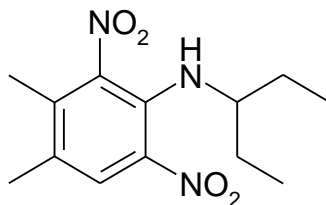


*Slika 2.1. Strukturna formula bentazona*

Bentazon se ubraja u grupu benzotiadiazinona (slika 2.1.). Selektivni herbicid koji djeluje protiv nepoželjnih biljaka, isključivo preko zelenih (živih) biljnih dijelova. Zeleni dijelovi korova postepeno žute i nakon nekoliko dana potpuno osuše. Viša relativna vlaga zraka i temperatura pojačavaju učinkovitost pripravka, ali mu istovremeno smanjuju tolerantnost. Prvi simptomi na tretiranim korovima vidljivi su nakon 2 - 7 dana od primjene. Kod osjetljivijih sorti krumpira, soje i graha moguća prolazna pojava fitotoksičnih pjega na višim temperaturama. Herbicidi koji sadrže bentazon na visokim temperaturama mogu otpustiti otrovni sumpor i pare dušika (Knauber et al., 2000).

### 2.2.2 PENDIMETALIN (C<sub>13</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)

Pendimetalin (slika 2.2.) se ubraja u dinitroaniline te ima širok spekatar učinkovitosti na dikotiledone korove.

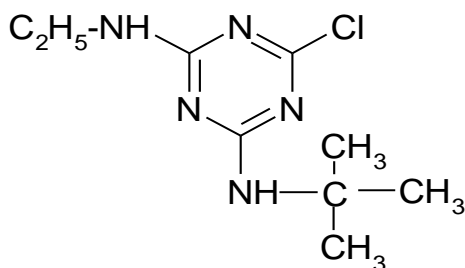


*Slika 2.2. Strukturna formula pendimetalina*

Naziva se tzv. žutim spojem zbog prisutnosti nitro grupe na fenilnom prstenu. Pendimetalin se koristi u raznim formulacijama kako bi djelovao na sprječavanje rasta korova u pamuku, riži, soji i duhanu (Smith et al., 1995). To je selektivni herbicid apsorbiran od strane korijena i lišća (Tomlin, 2011). Rasprostranjena uporaba tog herbicida dovela je do otkrivanja onečišćenja u tlu i vodi (Roca et al., 2009). Vijek poluživota mu je oko 90 dana (Mohan et al., 2007) te se može razgraditi postupcima fotodegradacije, ili biorazgradnje (Mohan et al., 2007; Zhang et al., 2000).

### 2.2.3 TERBUTILAZIN (C<sub>9</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>6</sub>)

Terbutilazin (C<sub>9</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>6</sub>) se ubraja u grupu triazina (slika 2.3.) te se primjenjuje kod sprječavanja širokolisnih korova u poljoprivrednim kulturama (kukuruz, voćnjaci).



*Slika 2.3. Strukturna formula terbutilazina*

Njegov raspad u vodi je spor dok mu je brzina razgradnje u tlu u izravnoj vezi s povećanjem temperature. Korištenjem terbutilazina moguće je izazvati zagađenje zraka, vode, tla, a naposljetku i hrane. Utjecaj na ljude mu je vrlo teško utvrditi (EFSA, 2011).

## 2.3 MEHANIZAM DJELOVANJA HERBICIDA

Herbicidi u biljku mogu dospjeti:

- 1) *kroz list*
- 2) *kroz korijen*

Sredstvo dolazi na površinu lista te kroz kutikulu, epidermu i palisadni parenhim prodire do floema, dalje se preko asimilata sistematično translocira do mjesta djelovanja.

Prskanjem po površini ili unošenjem u tlo odvija se postupak djelovanja herbicida kroz korijen. Za aktivaciju sredstva potrebne su oborine. Korovna biljka upija herbicid nakon što ga je kiša svojim djelovanjem dovela do zone korijena korovne biljke. Uz prisutnost vode, herbicid može prodirati kroz epidermu u endodermu primarne kore preko ksilema, gdje uzlaznim kretanjem vode u biljci dopijeva do mjesta djelovanja (Hornsby, 1996).

Herbicidi su sposobni zaustaviti ili usporiti životno važne fiziološke procese biljke te se s gledišta utjecaja na fiziološke procese mogu podijeliti u sljedeće grupe (Baličević i Ravlić, 2014):

- Inhibitori acetolaktat sintaze (ALS)
- Inhibitori acetyl CoA karboksilaze (ACCase)
- Inhibitori biosinteze karotenoida
- Inhibitori DHP (dihidropteroat) sintaze
- Inhibitori diobe stanica
- Inhibitori EPSP sintaze
- Inhibitori fotosinteze u fotosustavu I
- Inhibitori fotosinteze u fotosustavu II
- Inhibitori glutamin sintetaze
- Inhibitori protoporfirinogen oksidaze (PPO)
- Inhibitori sinteze lipida
- Inhibitori sinteze stanične stjenke (celuloze)
- Sintetski auksini (regulatori rasta ili hormonski herbicidi)

Inhibitori acetyl CoA karboksilaze (ACCase) prekidaju sintezu masnih kiselina, uzrokuju izostajanje razvoja novih listova, razvijeno lišće poprima crvenkastu boju, biljke ugibaju za 10–14 dana (Duke i Nenyon, 1988; Wilkinson, 1988).

Inhibitori acetolaktat sintaze (ALS) zaustavljaju sintezu proteina i nukleinskih kiselina, uzrokuju prestanak rasta i klorozu, za 1 do 4 tjedna dolazi do pojave nekroza (Ridley, 1982).

Inhibitori fotosinteze u fotosustavu II temelje se na ometanju prijenosa elektrona u fotosustavu II, pojavi kloroze na rubovima listova, te u konačnici nekroze (Trebst, 1987).

Inhibitori fotosinteze u fotosustavu I - ometaju prijenos elektrona u fotosustavu I.

Inhibitori protoporfirinogen oksidaze (PPO) oksidiraju protoporfirinogen IX u protoporfirin IX, u prisutnosti svjetla stvara kisikove radikale, dolazi do kloroze, kasnije i do nekroze.

Inhibitori biosinteze karotenoida dovode do destrukcije klorofila, blijedenja biljaka, zaostajanje u rastu i ugibanje.

Inhibitori EPSP sintaze inhibicijom enzima 5-enolpiruvil šikimat-3-fosfat sintaze sprječavaju sintezu aromatskih aminokiselina (Duke, 1988) zaustavlja rast, uzrokuje klorozu na listovima, starije lišće pocrveni, na kraju ugiba.

## 2.4 PERZISTENTNOST HERBICIDA

Sposobnost održavanja herbicida u tlu, vodi ili biljkama, odnosno stupanj njihove održivosti u prirodnim uvjetima definiramo kao perzistentnost. To je mjera kojom se izražava koliko dugo sredstvo ostaje u aktivnoj formi na mjestu tretiranja ili u okolišu.

Različiti su periodi zadržavanja herbicida u tlu, od nekoliko dana do nekoliko godina (Ostojić, 2003a; Hornsby et al., 1996; Piotrowicz-Cieślak i Adomas, 2012.). Herbicid bi se u tlu u aktivnom stanju trebao dovoljno dugo zadržati kako bi djelovao učinkovito na suzbijanje korova, ali dovoljno kratko da bi se smanjilo štetno djelovanje na čovjeka i okoliš. Perzistentnost herbicida poželjna je osobina koja omogućuje njihovo duže rezidualno djelovanje, a time i uspješniju zaštitu od korova.

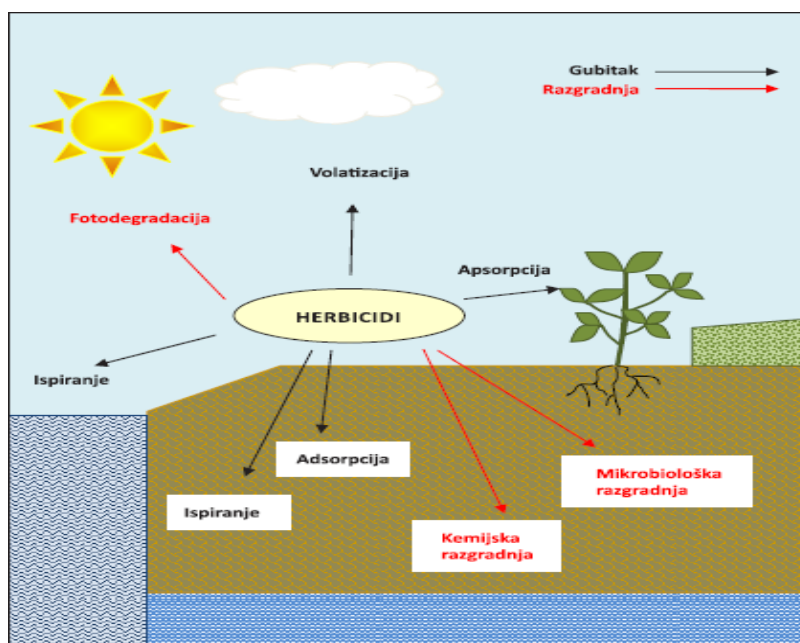
S druge strane perzistentni herbicidi mogu imati i nepoželjne učinke kao što su (Baličević i Ravlić, 2014):

- a) štetan utjecaj na osjetljive kulture u plodoredu,
- b) sužavanje plodoreda, a time i izbora herbicida,
- c) doprinos akumulaciji herbicida u tlu i biljnim proizvodima u naknadno posijanim kulturama i
- d) nepovoljan utjecaj na mikroorganizme u tlu.

Na perzistentnost herbicida u tlu utječu različiti čimbenici kao što su njihova stabilnost, koncentracija, oblik formulacije, tip tla, sadržaj organske tvari, mikroorganizmi, temperatura, klima, padaline i slično (Ostojić, 1987).

## 2.5 GUBICI HERBICIDA

Dospijeće herbicida u tlo podložno je različitim procesima gubitaka do kojih dolazi prilikom ispiranja u dublje slojeve, isparavanja, apsorpcije od strane biljke te tijekom adsorpcije na minerale i organske koloide iz tla što se vidi na slici 2.4. (Baličević i Ravlić, 2014).



*Slika 2.4. Gubici i razgradnja herbicida (Baličević i Ravlić, 2014)*

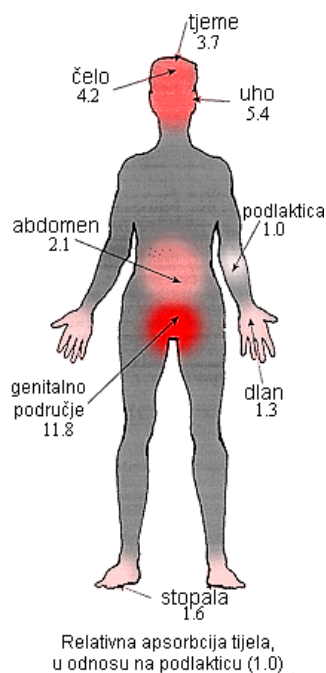
Ispiranjem u dublje slojeve herbicidi postaju nedostupni biljkama, a gubici mu ovise o topljivosti u vodi, količini vode te uspješnosti adsorpcije herbicida na koloidne čestice tla. Isparavanje herbicida podrazumijeva se tijekom i nakon njegove primjene. Intenzitet ovisi o kemijskim svojstvima herbicida i meteorološkim čimbenicima atmosfere kao što su vlažnost, tlak i temperatura zraka te vjetar. Molekule herbicida adsorbiraju se na minerale i organske koloide tla. Tla bogata organskom tvari imaju veliku moć adsorpcije herbicida, što ukazuje da adsorpcija herbicida ovisi o vrsti tla (Kubiak et al., 2008).

## 2.6 UTJECAJ PESTICIDA NA ZDRAVLJE LJUDI

Velika toksičnost pesticida zahtjeva pažnju prilikom primjene, pakiranja i proizvodnje. Pesticidi se od davnina primjenjuju u različitim područjima, od poljoprivrede, šumarstva pa sve do javnih ustanova uključujući poslovne zgrade, restorane, škole, parkove, golf terene te uz ceste, pruge i dalekovode. Istraživanjem je utvrđeno kako se veliki broj pesticidnih spojeva nalazi u vodama, okolišu, zraku, magli, kiši i tlu (Schulze et al., 1997).

Obzirom kako se pesticidi nalaze svuda oko nas, postoji i opasnost od unošenja pesticidnih spojeva u tijelo čovjeka. Postoje tri načina unošenja pesticida u tijelo ljudi: oralno, dermalno te udisanjem. Oralno unošenje pesticida se očituje prilikom konzumacije hrane i pića u kojima su sadržani pesticidi. Udisanje pesticida nastupa kada se čovjek nalazi u okolišu u kojem postoje pare, aerosoli ili male čestice pesticida. U neposrednom dodiru s pesticidima dolazi do dermalnog načina unošenja pesticida u tijelo. U razvijenim zemljama postoje propisi koji određuju način uporabe pesticida te je obavezna provjera utjecaja pesticida na živa bića (Bolognesi i Merlo, 2011).

Glavni način unosa herbicida tj. dermalno, štetno djeluje na kožu te pri tome može uzrokovati kožni osip i kontaktni dermatitis, također mogu nastati astmatični napadaji ili čak anafilaktički šok. Klorfenoksi-herbicidi uzrokuju glavobolju, vrtoglavicu, nervozu, netoleranciju na hladnoću, dispneju, a u težim slučajevima urođene mane, rak, sarkom mekog tkiva, ne-Hodgkinov limfom (*non-Hodgkin*, NHL) i Hodgkinov limfom (Curtis, 2001). Pri kroničnoj izloženosti triazinskim herbicidima dolazi do gubitka na težini, pojave zloćudnih tumora mliječne žlijezde kod žena, adenokarcinoma i karcinosarkoma te smanjene reprodukcije (Krieger, 2001).



**Slika 2.5.** *Relativna apsorpcija pesticida u ljudskom tijelu*

([http://www.agf.gov.bc.ca/pesticides/b\\_2.htm](http://www.agf.gov.bc.ca/pesticides/b_2.htm))

Na slici 2.5. prikazana je relativna adsorpcija pesticida u ljudskom tijelu u odnosu na podlakticu. Najveća adsorbcija pesticida, koja je čak 11,8 puta veća od adsorbcije na podlaktici, odvija se u genitalnom području. Trovanje pesticidima najčešće je uzrokovano upotrebom zaštitne opereme koja nije zadovoljavajuća za primjenu prilikom korištenja pesticida. Također se trovanje javlja kao posljedica ne poštivanja zakonskih propisa i regulativa (Bolognesi i Merlo, 2011). Utjecaj pesticida na ljudsko zdravlje još nije u potpunosti istražen, stoga je remedijacija pesticida s onečišćenih lokaliteta izrazito važna.



## 2.7 ENZIMI KAO BIOKATALIZATORI

Mnogi procesi u prehrambenoj, kemijskoj i farmaceutskoj industriji zasnivaju se na bioprocima. Biološki materijal bioprocisa su stanice mikroorganizama, životinja, biljaka te njihovi dijelovi tj. enzimi u svrhu novih produkata ili uklanjanja toksičnih tvari iz otpadnih tokova (Faber, 2011). Aktivni dio stanica su enzimi koji predstavljaju biološke katalizatore jer ubrzavaju reakcije u živim organizmima. Za njihov rad potrebno je održavati biološke uvjete (pH, temperatura, razrijeđenje vodene otopine, atmosferski tlak). Uvjeti moraju biti strogo kontrolirani jer biološki materijal ne podnosi ekstremne tlakove i temperature, moraju se održavati uvjeti u području u kojem je materijal stabilan i aktivan.

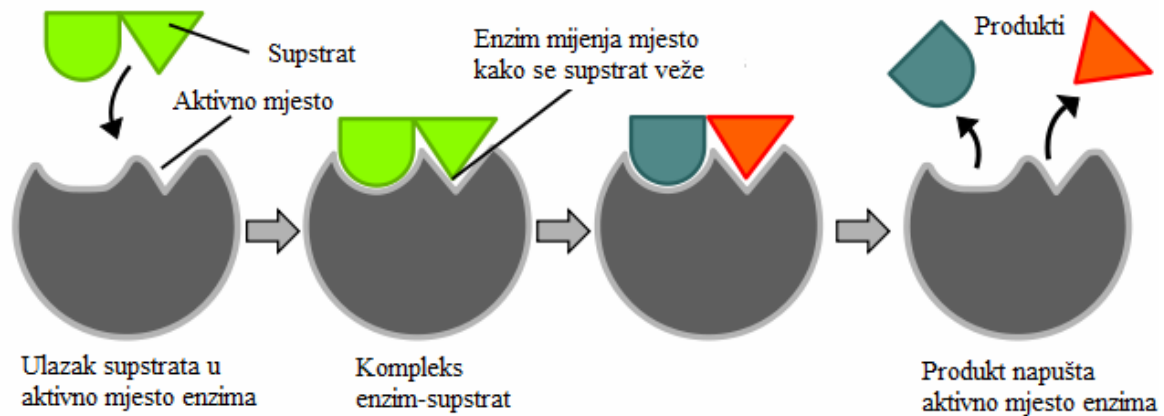
Primjenom enzima povećava se produktivnost procesa, smanjuje se potrošnja reaktanta te količina nastalog otpada, ne koriste se toksične sirovine i nastaju proizvodi visoke kakvoće (Giorno i Drioh, 2000). Trenutno je zabilježeno oko 3200 enzima prema International Union of Biochemistry, a pretpostavlja se da ih u prirodi postoji oko 25 000. Međutim, manji dio enzima koji je dosada istražen (približno njih 300, što je oko 10 %) dostupan je na tržištu (Schmid et al., 2001). Enzimi kao biokatalizatori se koriste u dva osnovna oblika: kao pročišćeni enzimi i kao enzimi u cijelim stanicama. Enzimi su katalizatori u biološkim sustavima, dakle ubrzavaju kemijsku reakciju pri čemu se ne troše, niti se mijenjaju.

Pokazuju tri glavna tipa selektivnosti:

- 1) kemoselektivnost - djeluju na jedinstveni tip funkcionalne skupine,
- 2) regioselektivnost - razlikuju funkcionalne skupine koje su smještene u različitim područjima iste molekule supstrata i
- 3) enantioselektivnost - enzim prepoznaje svaki oblik kiralnosti prisutan u supstratu stvaranjem enzim-supstrat kompleksa (Faber, 2011).

Enzimi imaju veliku djelotvornost s obzirom na neenzimske reakcije, a primjenjuju se u malim koncentracijama  $10^{-3} - 10^{-4} \%$ . Izrazito su prihvatljivi za okoliš obzirom da su biorazgradivi, proizvode se iz obnovljivih izvora te stvaraju malo otpada. Osnovni problemi koji se javljaju kod enzima su visoka cijena pročišćavanja i izolacije, te inaktivacija zbog promjene bioloških uvjeta (Faber, 2011).

Kako se proces katalize odvija na aktivnom mjestu enzima, djelovanje biokatalizatora započinje tvorbom kompleksa sa supstratom. U kompleksu enzim je vezan uz supstrat Van der Waalsovima i elektrostatskim silama, vodikovim vezama ili rjeđe, kovalentnom vezom. Kompleksiranje mora biti brzo i reverzibilno tako da se produkt odvaja od enzima odmah nakon reakcije i oslobađa enzim za daljnje katalitičko djelovanje (Schmid et al., 2001). Postoje dva modela interakcije enzima i supstrata. Jedan od njih predložio je E. Fisher 1894. Prema njegovoj teoriji enzim je komplementaran prijelaznom stanju, tj. onomu kemijskom obliku koji supstrat mora poprimiti pri prelasku u produkt reakcije, pa je upravo to razlogom ubrzanja reakcije. Enzim dakle može promijeniti oblik aktivnog mjesta pod utjecajem strukture supstrata (slika 2.6.), takav proces naziva se inducirano pristajanje (Faber, 2011).



**Slika 2.6.** Enzimski katalizirane reakcije (Faber, 2011)

Razlikuju se:

- oksidoreduktaze (kataliziraju biološke reakcije oksidacije i redukcije),
- transferaze (kataliziraju prijenos funkcionalnih skupina),
- hidrolaze (kataliziraju reakcije hidrolize),
- liaze (kataliziraju reakcije eliminacije uz stvaranje dvostruke veze ili adicije na dvostruku vezu),
- izomeraze (kataliziraju pregradnju unutar molekula) i
- ligaze (kataliziraju stvaranje veze uz istovremenu hidrolizu ATP-a).

Enzimi koji kataliziraju reakcije oksidacije i redukcije prijenosom vodikovog ili kisikovog atoma ili elektrona od jednog supstrata do drugog u bioprocesima nazivaju se oksidoreduktaze (Humell, 1999). Oksidoreduktaza i hidrolaza (Meulenberg et al., 1997) imaju sposobnost oksidacije supstrata ili njegove djelomične razgradnje.

U organskim sintezama velika se važnost pridaje oksidoreduktazama, zbog velikog broja supstrata s kojima reagiraju te zbog enantio-, regio- i stereo- selektivnih svojstava (Sariaslani i Rosazza, 1984). Također se primjenjuju za sintezu lijekova, steroida, polimera, oksidativnu razgradnju onečišćujućih tvari, te za konstrukciju biosenzora za različite analitičke i kliničke primjene (May, 1999).

## 2.8 BIOKATALIZATORI U INDUSTRIJI

Široka mogućnost primjene i sposobnost kataliziranja širokog raspona kemijskih reakcija jedna je od odlika enzima, no primjena im je ograničena komercijalnom dostupnošću (Zaks, 2001). Odabir dobrog biokatalizatora podrazumijeva poznavanje potreba tržišta, kriterija samog proizvoda cijene, funkcionalnosti, kvalitete, sigurnosti te isplativosti procesa. Ključni kriterij je cijena biokatalizatora, kako bi bio isplativ, no prije svega mora biti siguran za upotrebu uključujući proizvođače i korisnike biokatalizatora.

Industrijska biotehnologija se upotrebljava u brojnim industrijskim sektorima primjerice u prehrambenoj industriji (proizvodnja stočne hrane), papirnoj (celuloze i papira), kožnoj, tekstilnoj, proizvodnji detergenata i energije na izmjenama škroba i masti u prehrambenom sektoru (Kirk et al., 2002), kao i kod proizvodnje organskih spojeva, aminokiselina i vitamina fermentacijom (Frazzetto, 2003). Idealni biokatalizator mora zadovoljiti kriterije poput: visoke volumne aktivnosti, selektivnosti, specifičnosti supstrata, niske cijene, jednostavnog uvećanja procesa i puštanja u pogon, reproduktivnosti i pouzdanosti, veliku tržišnu potrebu i vrijednost (Hoeks et al., 1995)

## 2.9 KOFAKTOR

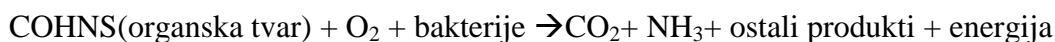
Kako bi postigli svoje specifično djelovanje veliki broj enzima zahtijeva kofaktor. Katalizatori oksidacijskih i redukcijskih reakcije, oksidoreduktaze, te ligaze, koje kataliziraju sintezu ili razgradnju kompleksnih spojeva, zahtijevaju koenzime za svoju aktivnost. Između različitih paralelnih reakcija kao transportni metaboliti djeluju koenzimi te prenose vodik, kisik ili elektrone s jedne strane, tj. molekule ili atome s druge strane (Vasić – Rački i Wichmann, 2005).

Kofaktor je neproteinska molekula vezana čvrstim ili slabim vezama za enzim i nužna je za njegovu aktivnost. Razlikujemo organske i anorganske kofaktore. Esencijalni metali kako još nazivamo anorganske kofaktore, mogu biti slabo vezani aktivacijski ioni ili metalni ioni metaloenzima koji su čvrsto vezani. U organske kofaktore ubrajaju se koenzimi slabo vezani na enzim i prostetske čvrsto vezane molekule (Drauz, 2012). Kofaktor prenosi vodik, kisik ili elektrone s jedne odnosno atome s druge strane između paralelnih reakcija, djeluje kao transportni metabolit.

## 2.10 BIOREMEDIJACIJA

Proces bioremedijacije odvija se uz prisutnost mikroorganizama, prirodnim procesom mikrobiološke razgradnje odnosno interakcijom mikroorganizama i sastojaka otpada. U procesu bioremedijacije odvijaju se tri različita procesa (Von Sperling et al., 2007).

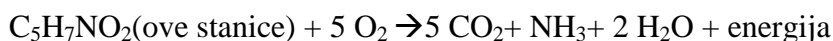
*Proces oksidacije:*



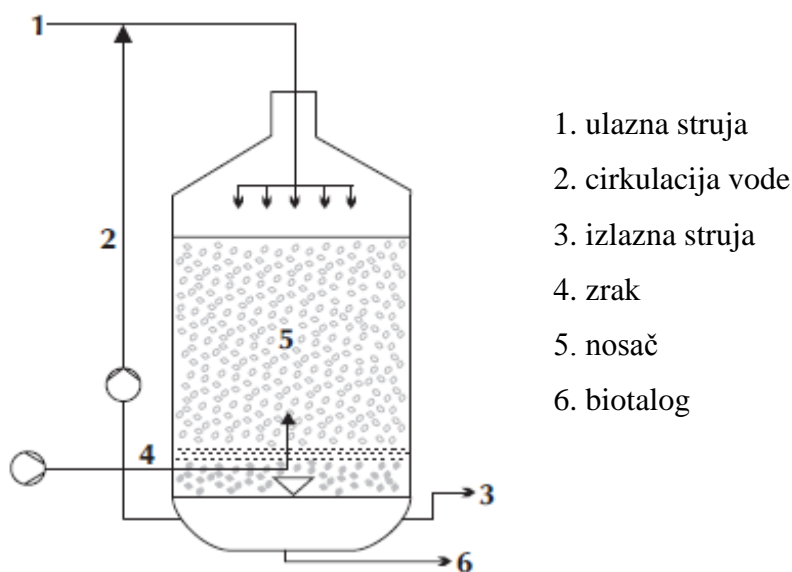
*Proces biosinteze:*



*Proces autooksidacije:*

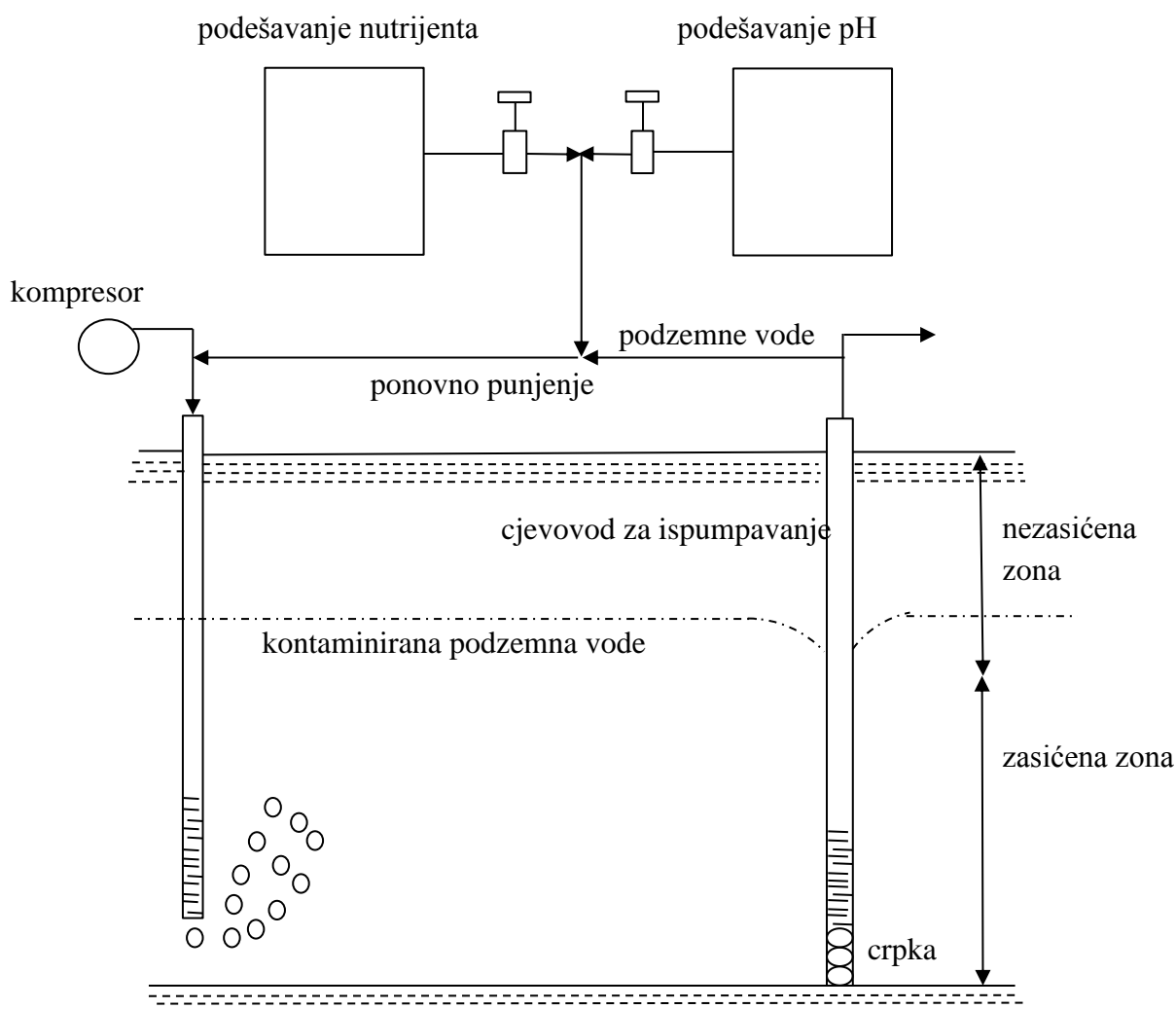


Bioremedijacijski se postupci općenito mogu podijeliti na *ex situ* i *in situ* postupke. *Ex situ* postupci uključuju korištenje bioreaktora, biofiltara i postupak kompostiranja kako je prikazano na slici 2.7. Bioremedijacija *in situ* uključuje bioventiliranje, bioprskanje i biostimulaciju (Frazar, 2000). Krajnji produkti bioremedijacije trebaju biti  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}$  bez stvaranja međuprodukta, te obje metode uključuje uvođenje kisika u propusno tlo radi povećanja aktivnosti aerobnih mikroorganizama. Kod primjene bioreaktora otpadna onečišćena voda kapa na čvrstu podlogu koja je kolonizirana mikroorganizmima. Mikroorganizmi razgrađuju onečišćujuće tvari, a prije nego se produkt razgradnje ukloni, važno je odrediti koncentraciju mikroorganizama u njemu.



Slika 2.7. Bioreaktor (Đokić et al., 2012)

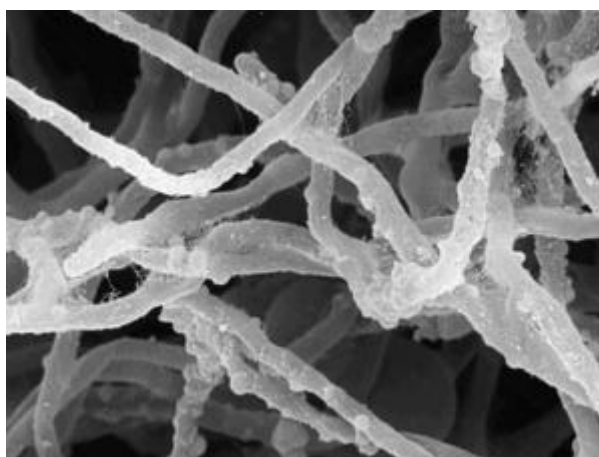
Zatvorena posuda gdje se miješaju onečišćeni medij, dodaci i mikroorganizmi je drugi tip reaktora koji se često primjenjuje. Upravo zatvoreni sustav omogućava kontrolu parametara kao što su pH te kisik. Nakon miješanja s kisikom kako bi proces bio aeroban, otpadni medij se uvodi u sustav (slika 2.8.). Ovi se bioreaktori upotrebljavaju za obradu onečišćenog tla, pri čemu se voda dodaje u tlo te se nastala emulzija dalje obrađuje (Frazar, 2000). Navedeni sustavi najčešće se primjenjuju za pročišćavanje voda pri čemu se upotrebljavaju crpke za uklanjanje onečišćene vode iz vodonosnika. Onečišćena voda se crpkama odvodi u bioreaktor u koji se dodaju hranjive tvari i elektron-donori da bi se povećala razgradnja autohtonim mikroorganizmima. Ako obrađena voda nije zadovoljila tražene kriterije čistoće, sprema se u spremnike ili se recirkulacijom vraća u novi ciklus uz dodatak novih hranjivih tvari. Proces se nastavlja dok se ne zadovolje zadani kriteriji čišćenja (Quintero, 2006).



**Slika 2.8.** Bioremedijacija in situ (Frazar, 2000)

Sve veći interes se javlja za primjenu gljiva kao bioremedijacijskih sredstava (Reddy, 1995; Cameron i Aust, 1999; Cameron et al., 2000; Pointing, 2001).

Posebno zanimanje je vezano za gljive bijelog truljenja, koje su sveprisutne u našem okruženju, a jedinstvene su među eukariotskim i prokariotskim mikroorganizmima. Utvrđeno je da gljive bijelog truljenja iz roda *Phanerochaete* učinkovito razgrađuju toksične tvari. Većina istraživanja provedena je s vrstom *Phanerochaete chrysosporium* (slika 2.9.), koja razara postojane spojeve, dok su *Phanerochaete sordida*, *Pleurotus ostreatus*, *Phellinus weirii* i *Polyporus versicolor* pokazali dobre rezultate u laboratorijskim uvjetima jer mogu razgraditi klordan, lindan i DDT (Barr i Aust, 1994).



**Slika 2.9.** *Phanerochaete chrysosporium*  
([https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Phanerochaete\\_chrysosporium](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Phanerochaete_chrysosporium))

## 2.11 FITOREMEDIJACIJA

Fitoremedijacija je definirana kao *zelena tehnologija* zbog primjene biljaka za razgradnju različitih onečišćivača (Salt et al., 1995; Garbisu et al., 2002, Cycoňa et al., 2009). Smatra se da je mehanizam transporta i razgradnje organskih onečišćivača u biljkama sljedeći: sustav korijenja utječe na fizička i kemijska svojstva tla, pri čemu dolazi do znatnog povećanja populacije mikroorganizama i različitosti populacije. Nakon toga slijedi opskrba krajeva korijenja metabolitima razgradnje, stimulacija i humifikacija te naposljetku upijanje i unos u biljku te translokacija (Günther et al., 2000). Biljke se zapravo koriste kao katalizatori za pojačavanje mikrobnog rasta i aktivnosti što u konačnici pojačava potencijal biorazgradnje.

Fitoremedijaciju, koja se smatra najmanje štetnom metodom, možemo podijeliti na fitoekstrakciju, rizofiltraciju, fitorazgradnju i fitostabilizaciju. Postupak u kojemu biljka koja ima sposobnost akumulacije transportira onečišćivač iz tla te ga pohranjuje u svoje tkivo naziva se fitoekstrakcija. Rizofiltracija je postupak pri kojemu korijen biljke adsorbira toksine iz vode. Fitorazgradnja se definira kao postupak pri kojemu biljke ili mikroorganizmi razgrađuju onečišćivač. Fitostabilizacija je naziv za postupak kod kojeg se onečišćivač veže u strukturu biljke upijanjem, pri čemu se smanjuju migracije onečišćivača kroz tlo (Đokić et al., 2012). Kada biljka transformira organske onečišćivače u manje toksične, sporije i nestabilnije molekule, dolazi do procesa fitotransformacije. Proces fitotransformacije uključuje fitorazgradnju pri čemu biljka enzimima cijepa organsku molekulu koju naposljetku izlučuje kroz lišće u zrak. Na taj se način jedan onečišćivač zamjenjuje drugim. Fitotransformacija nastaje kada biljka transformira organska onečišćivala u manje toksične, manje pokretne i nestabilnije molekule. Taj proces uključuje fitorazgradnju, pri čemu biljka metabolizira odnosno enzimima cijepa organsku molekulu te je izlučuje kroz lišće i tako ispušta u zrak, čime se jedan onečišćivač zamjenjuje drugim. Sam proces fitoremedijacije nije idealno rješenje za uklanjanje većine onečišćivača. Limitirajuću faktor je dubina tla, odnosno dužina korijenja te dubina vodonosnika (Frazar, 2000).



### 3. PREGLEDNI DIO

Bioremedijacija je biološki proces koji čisti zagađene stanice te ima potencijal da bude jeftinija i ekološki prihvatljivija. Temelji se na biološkim sustavima kao što su bakterije, gljive, biljke i enzimi te kao takva ima mogućnost mijenjati kemijsku strukturu onečišćenja u manje opasan konačni produkt (Gianfreda i Rao, 2004). Bakterije i gljive su glavni mikroorganizmi koji imaju sposobnost razgradnje herbicida. Vrsta *Pseudomonas* degradira veliki broj različitih herbicida. 1985. godine otkriveno je da gljiva bijelog truljenja *Phanerochaete chrysosporium* ima sposobnost razgradnje većeg broja onečišćujućih tvari u okolišu zbog lignolitičkih enzima koje sadrži (Šašek, 2003; Gadd, 2001; Paszczynski i Crawford, 1995). Upravo se zbog svog nespecifičnog načina razgradnje sve više koriste u bioprocima obrade otpadnih voda, razgradnje organskih i aromatskih onečišćujućih tvari, eksploziva i pesticida (Wesenberg et al., 2003). Mnoga istraživanja također su provedena na drugim vrstama gljiva bijelog truljenja (Bending et al., 2002).

Sve je veće zanimanje za gljive bijelog truljenja (Asgher et al., 2008; Silva Coelho-Moreira et al., 2013) zbog posjedovanja specifičnih i nespecifičnih enzimskih sustava koji degradiraju lignin i onečišćujuće tvari. Enzimi se mogu koristiti u mnogim procesima remedijacije i ciljano djelovati na onečišćujuće tvari (Karam i Nicell, 1997; Durán, 1997a; Durán, 1997b). Lignolitički enzimi su skupina enzima koji kataliziraju oksidacijsku depolimerizaciju tj. razgradnju lignina (Kirk i Tien, 1998). U tu skupinu enzima ubrajamo lignin peroksidazu (LiP), mangan peroksidazu (MnP) i lakazu (Lacc). Već spomenute gljive bijelog truljenja su jedini poznati mikroorganizmi koji su razvili kompleksan enzimatski sustav koji im omogućava razgradnju lignina (Maciel et al., 2013).

Za funkcioniranje LiP potrebna su još dva metabolita koje gljiva sama proizvodi, a to su vodikov peroksid i veratril alkohol. Može djelovati na podlogama s visokim redoks potencijalom te je zbog toga ključan enzim za razgradnju organskih onečišćenja. MnP je enzim koji je po svom djelovanju sličan LiP, ali nema sposobnost djelovanja na podlogama visokog redoks potencijala.

Studije pokazuju kako su enzimi odgovorni za transformaciju postojanih onečišćujućih molekula, uključujući otrovne herbicide (Marcos-Urrea i Reddy, 2012). Primjenom nesterilnih supstrata *P. chrysosporium* pokazani su značajni učinci na razgradnju nekoliko herbicida među kojima i bentazon. *Bajerkandera adusta* pokazala je također veliku sposobnost razgradnje molekula zagađivača, posebno policikličkih

aromatskih ugljikovodika i sintetičkih boja (Heinfling et al., 1997). Gljive iz roda *Pleurtus*, poznate su kao dobri proizvođači lignolitičkih enzima uglavnom lakaze i mangan peroksidaze (Tychanowicz et al., 2004). *Trameter versicolor* u kombinaciji sa različitim posrednicima provodi razgradnju herbicida, pa tako lakaza iz *T. versicolor* uz prisutnost medijatora  $MnSO_4$  i Tween 80 postiže visoki postotak razgradnje. Također su ispitani *Coriolopsis fulvocenerea*, *Cerrena maxima* i *Coriolus hirsutus* te su autori pronašli kako je najbolja razgradnja postignuta kod onih gljiva koje proizvode lakazu (Gorbatova et al., 2006). Smanjenje koncentracije bentazona potvrđeno je primjenom *Ganoderma lucidum* kulture. Bending i suradnici (2002) su utvrdili kako *Hypholoma fasciculare* ima sposobnost degradacije triazinskih herbicida, terbutilazina.

Nije uočena značajna razlika između gljiva bijelog truljenja u njihovoj sposobnosti razgradnje pesticida, ali može se zamjetiti ovisnost vrste gljiva o razgradnji određenih pesticida. Iz toga proizlazi da mehanizam razgradnje ovisi o kemijskom sastavu. U dosadašnjim istraživanjima uočena je povezanost aktivnosti mangan-peroksidaze i lignin-peroksidaze, koje proizvodi *Phanerochaete chrysosporium*, sa smanjenjem koncentracije herbicida (Castilo et al., 2000; Castilo et al., 2001).

Osim lignolitičkih enzima ujedno su istraživani i ostali enzimi koji se mogu koristiti za razgradnju herbicida. Također je ispitivana mogućnost korištenja organofosforne hidrolaze (OPH) za katalizu reakcije hidrolize organosfosfornih spojeva. Primjena OPH u procesima detoksifikacije prilično je ograničena zbog visoke cijene enzima i njegova kratkog katalitičkog poluživota (Mansee, 2005). Ujedno je moguće uklanjanje onečišćujuće tvari iz okoliša pomoću enzima biljnog porijekla, odnosno postupcima fitoremedijacije. Gramms i suradnici (1999) su istraživanjem izlučivanja enzima iz 12 biljnih vrsta pokazali da mahunarke, trave i pomoćnice (*Solanaceae*) učinkovito ispuštaju oksidaze i hidrolaze u tlo putem korijenja. Oba postupka bioremedijacije temelje se na proizvodnji ekstracelularnih enzima i/ili cijelih stanica. Učinkovitost procesa obrade vode ovisi o optimalnim uvjetima rada kao što su pH, temperatura, koncentracija biokatalizatora te koncentracija herbicida koji neposredno utječu na brzinu reakcije (Okpokwasili i Nweke, 2005). Pregledom literature pronađeno je mnoštvo metoda za uklanjanje herbicida iz tla. U nastavku rada će sistematizirano biti opisane metode za uklanjanje bentazona, terbutilazina i pendimetalina.

### 3.1 METODE UKLANJANJA BENTAZONA IZ VODE

Bentazon kao kemijski relativno inertan te neki od njegovih metabolita (2-amino-N-izopropil-benzamid, AIBA; desizopropil-bentazin (engl. *des-isopropyl-bentazon*); 8-kloro-bentazon) inkubirani su s enzimima, lakazom ili peroksidazom koje proizvodi *Polyporus pinsitus*, u prisutnosti ili bez humusnih monomera. Gvajakol (engl. *guaiacol*) i ferulna kiselina (engl. *ferulic acid*) korišteni su kao elektron-donor kosupstrata te se pokazalo da pospješuju razgradnju bentazona.

Reakcija bentazona s gvajakolom u prisutnosti lakaze ili peroksidaze bila je gotovo potpuna nakon 30 minuta. 6-hidroksi i 8-hidroksi bentazon su u potpunosti transformirani svakim enzimom sa i bez kosupstrata. Pri pH 3,0 u prisustvu lakaze i gvajakola, koncentracija bentazona i njegovih metabolita smanjila se za 27%, 57%, 20% i 4% (tablica 3.1.).

**Tablica 3.1.** Reakcija bentazona i njegovih metabolita s gvajakolom i ferulnom kiselinom u prisutnosti *Polyporus pinsitus*- lakaza (Kim et al., 1998)

SPOJ	% TRANSFORMACIJE LAKAZOM					
	Kontrolna		Gvajakol		Ferulna kiselina	
	pH 3,0	pH 5,6	pH 3,0	pH 5,6	pH 3,0	pH 5,6
<b>Bentazon</b>	0	0	27	0	9	0
<b>6-hidroksi-bentazon</b>	100	100	100	100	100	100
<b>8-hidroksi-bentazon</b>	100	100	100	100	100	100
<b>AIBA</b>	6	0	57	34	16	40
<b>Des-izopropil-bentazon</b>	0	0	20	3	12	0
<b>8-kloro-bentazon</b>	0	0	4	3	0	0

U tablici 3.2. je prikazana razina transformacije s peroksidazom, pri pH 3,0, bila je 9%, 70%, 30% i 5%. Transformacija je smanjena povećanjem pH vrijednosti. Pri niskom pH, hidroksi-bentazoni su potpuno transformirani. Transformacija bentazona lakazom povećanje je povećanjem koncentracija gvajakola (Kim et al., 1998).

**Tablica 3.2.** Reakcija bentazona i njegovih metabolita s gvajakolom i gerulnom kiselinom u prisutnosti *Polyporus pinsitus* - peroksidaza (Kim et al., 1998)

SPOJ	% TRANSFORMACIJE PEROKSIDAZOM					
	<i>Kontrolna</i>		<i>Gvajakol</i>		<i>Ferulna kiselina</i>	
	pH 3,0	pH 5,6	pH 3,0	pH 5,6	pH 3,0	pH 5,6
<b>Bentazon</b>	6	0	9	0	19	0
<b>6-hidroksi-bentazon</b>	100	100	100	100	100	100
<b>8-hidroksi-bentazon</b>	100	100	100	100	100	100
<b>AIBA</b>	10	11	70	10	30	40
<b>Des-izopropil-bentazon</b>	10	12	30	5	15	13
<b>8-kloro-bentazon</b>	5	0	5	0	10	12

Li i suradnici (2008) opisuju metodu koja objašnjava razgradnju atrazina i bentazona te njihove kombinacije u području rizosfere kukuruza i na ne-rizosfernim tlima. Rizosferna zona, odnosno zona mikrobne aktivnosti je u neposrednoj blizini korijena biljke (Curl i Truelove, 1986). Vrlo je vjerojatno da rizosfera ima potencijal za ubrzavanje biorazgradnje organskih onečišćujućih tvari (Anderson et al., 1993).

Metoda uklanjanja herbicida provedena je izvedena uzimanjem uzoraka rizosfernog tla od 50 g suhe mase koji je odmjerjen u obujmu od 100 mL Erlenmeyerovom tikvicom. Nakon toga pristupilo se autoklaviranju uzorka na temperaturi od 120°C, 30 minuta te tako tri dana uzastopno. Iz takvog uzorka određivano je vrijeme poluraspada kombinacije atrazina i bentazona, kao i zasebno dodanih herbicida te smjesa atrazina, bentazona i površinski aktivne tvari (Kim et al., 1998).

Kinetika razgradnje herbicida opisana je jednadžbama 3.1. i 3.2.

$$\ln \left( \frac{c_t}{c_o} \right) = -k \cdot (t - t_{lag}) \quad (3.1.)$$

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k} \quad (3.2.)$$

Gdje su:

$c_t$  –koncentracija herbicida u vremenu  $t$

$c_o$ - početna koncentracija

$k$ - konstanta razgradnje

$t_{lag}$ - faza zaostajanja u kojoj se ne javlja razgradnje

$t_{1/2}$ - vrijeme poluraspada

Konstanta razgradnje bentazona u rizadosfernom tlu, *RT*, ne razlikuje se značajno od one u ne-rizadosfernom, *NRT*. Vremena poluraspada bentazona u rizadosfernom i ne-rizadosfernom tlu zabilježena su nakon 20,2 i 19,9 dana te je na taj način pokazano kraće vrijeme poluraspada u odnosu na dosadašnja istraživanja kod kojih su vremena poluraspada iznosila od 38 do 88 dana. Pregledom literature (Li et al., 2008) pokazano je kako se u autoklaviranim rizadosfernim tlima bentazon nije značajno razgradio, dok je bez primjene autoklava razgradnja uspješnija, i u rizadosfernim i ne-rizadosfernim tlima. Utvrđeno je kako prisutnost zasađenog kukuruza na tim područjima može ubrzati razgradnju bentazona.

Primjena kombinacije dvaju herbicida pokazala je povećanje vremena razgradnje u usporedbi s pojedinačnim herbicidom što se vidi u tablici 3.3., dodavanjem površinski aktivnih tvari zajedno sa kombinacijom atrazina i bentazona smanjuje vrijeme razgradnje (Li et al., 2008).

**Tablica 3.3.** Vrijeme poluraspada bentazona (Li et al., 2008)

	$k [d^{-1}]$	$t_{1/2} [d]$	$t_{lag} [d]$
<b>BENTAZON</b>			
RT	0,03432	20,2	0
NRT	0,03475	19,9	6,8
RT antrazin-bentazon	0,02744	25,2	6,6
RT antrazin-bentazon-PAT	0,03233	21,4	4,2

Cilj istraživanja metode koju su razvili De Wilde i suradnici (2008) kako se navodi u literaturi, bio je prikazati teorijske i eksperimentalne podatke o migraciji pesticida u sustavu, kako bi se odredilo vrijeme zadržavanja te razgradnja odabranih pesticida. Unutar bačve od 75 L zajedno s bentazonom napravljeno je deset smjesa te su dodani vrtni kompost, kravlji izmet, treset, ilovača, vrba i slama te izmiješani u homogeni uzorak. Unutar svih 10 smjesa dodan je promatrani herbicid te kalijev bromid, a ostale komponente smjesa dodane su u različitim količinama što se može vidjeti iz tablice 3.4. (De Wilde et al., 2008).

**Tablica 3.4.** Sastav smjesa korištenih u metodi De Wildea i suradnika (2008)

[kg]	smjesa 1	smjesa 2	smjesa 3	smjesa 4	smjesa 5	smjesa 6	smjesa 7	smjesa 8	smjesa 9	smjesa 10
<b>Vrtni kompost</b>	-	-	-	-	-	8,17	14,71	-	-	6,54
<b>Kravlji izmet</b>	-	-	-	-	-	-	-	3,23	1,29	3,23
<b>Kokosova sječka</b>	-	-	2,57	5,13	-	-	10,5	-	5,13	2,05
<b>Treset</b>	5,36	9,44	5,25	9,44	5,25	-	-	4	8,4	4,2
<b>Slama</b>	1,41	1,35	0,68	-	0,68	1,36	-	1,36	-	0,68
<b>Sječena vrba</b>	-	-	-	-	6,31	-	-	-	-	1,262
<b>Pjeskovita ilovača</b>	30,24	6,04	30,27	6,04	30,23	30,15	6,04	30,18	6,04	6,04

Unutar uzorka uspostavljen je stalni protok vode. Svaka dva do tri dana uziman je uzorak (engl. *effluent*) te su mjereni pH i koncentracija prisutnih pesticida. Kao nereagirajuće sredstvo korišten je kalijev bromid kako bi se odredili fizikalni parametri migracije pesticida. Eksperiment je trajao sve dok koncentracije većine pesticida nisu postigle konstantnu vrijednost, otprilike 150 dana. Za opisivanje migracije pesticida u promatranom uzorku korišten je model HYDRUS-1D (Simunek et al., 2005). Na temelju Monodove kinetike proveden je izračun (Guimont et al., 2005) prema jednadžbi 3.3.:

$$R \frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} - v \frac{\partial c}{\partial z} - (\mu^* X) \cdot c \quad (3.3)$$

Homogenizirani uzorak koji sadrži kravlji izmet postiže bolju degradaciju pesticida. Nakon tromjesečnog istraživanja, koncentracija bentazona je značajno opala kod svih deset smjesa (tablica 3.5.). Najveći udio smanjivanja koncentracije bentazona zabilježen je u slučaju smjesa 7,9 i 10, gdje se koncentracija bentazona smanjila za 100%. Najmanje smanjenje zabilježeno je u smjesi 6 kod koje je dodano 8,17 kg vrtnog komposta, 1,36 kg slame te 30,15 kg pjeskovite ilovače.

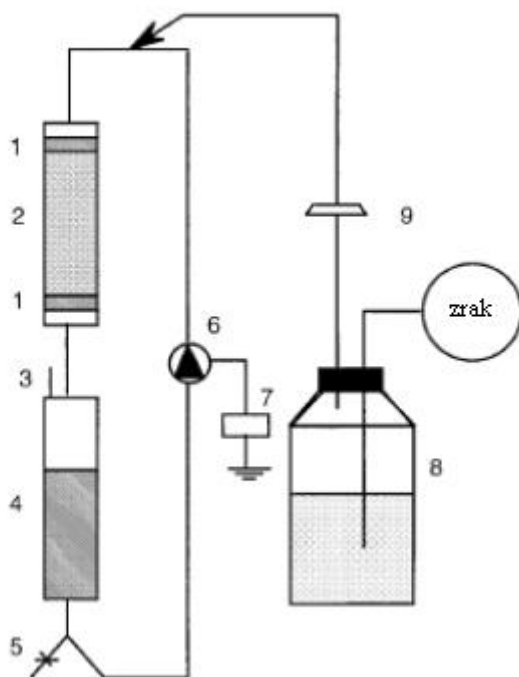
**Tablica 3.5.** *Usporedni prikaz koncentracija bentazona u početnom stanju i nakon tri mjeseca (De Wilde et al., 2008)*

<b>BENTAZON</b>	<b>Početno stanje [mg kg<sup>-1</sup>]</b>	<b>Nakon 3 mjeseca [mg kg<sup>-1</sup>]</b>	<b>Udio smanjenja u odnosu na početno stanje</b>
<i>smjesa 1</i>	1,3	0,53	59,23%
<i>smjesa 2</i>	2,5	0,04	98,40%
<i>smjesa 3</i>	0,97	0,07	92,78%
<i>smjesa 4</i>	1,48	0,02	98,65%
<i>smjesa 5</i>	1,13	0,57	49,56%
<i>smjesa 6</i>	0,38	0,25	34,21%
<i>smjesa 7</i>	0,22	0	100,00%
<i>smjesa 8</i>	1,3	0,3	76,92%
<i>smjesa 9</i>	1,33	0	100,00%
<i>smjesa 10</i>	0,39	0	100,00%

U jednom od radova korištena je analitička metoda ekstrakcije čvrste faze (engl. *solid-phase extraction*) plinskom kromatografijom (engl. *gas chromatography*) i masenom spektrometrijom (engl. *mass spectrometer*), tzv. *SPE-GC-MS metoda*, pri čemu je analizirana degradacija 20 različitih pesticida (Peček et al., 2012). Brojne metode koriste plinsku kromatografiju za određivanje sadržaja pesticida u analiziranom uzorku površinske vode (Nevado et al., 2007; Wang et al., 2007).

Plinska kromatografija, GC, se koristi za detaljno određivanje ostataka pesticida u vodi. U kombinaciji s masenom spektrografijom (*MS*) postiže se bolja identifikacija i kvantifikacija pesticida. Uzorci vode od 100 ml zakiseljeni su do pH 4 te dopunjeni odgovarajućom koncentracijom pesticida. Uzorak iz kolone u kojemu se odvijala ekstrakcija na čvrstoj fazi (*SPE*) s etil-acetatom je uparen, dok je suhi ostatak otopljen u 1 mL acetona te 10 µL inertne otopine nakon iz čega je analiziran korištenjem plinske kromatografije i masene spektrometrije (Peček et al., 2012).

Kako bi se odredila učinkovitost razgradnje bentazona, proveden je eksperiment pomoću enzima gljive bijelog truljenja *Phanerochaete chrysosporium*. Bioreaktor (slika 3.1.) u kojem se provelo istraživanje, sastojao se od dvije cilindrične posude zatvorene gumenim čepovima i spojene staklenim cjevčicama. Cijela jedinica je sterilizirana, a sastojala se od slame u jednoj posudi, dva sloja sterilne vune ispod i iznad slamnatog sloja kako bi se poboljšala disperzija recirkulacijske tekućine (Torstensson i Castillo, 1997). Test je proveden u dvije serije A i B, po pet tretmana s različitom količinom dušika. U bioreaktoru je proučavana razgradnja, utjecaj dušika i hidrauličko vrijeme zadržavanja. Razgradnja se pokazala uspješnijom u prisutnosti manje dušika, na što ukazuje djelovanje lignolitičkog sustava gljiva.



**Slika 3.1.** Shema bioreaktora u kojem se proučavala razgradnja bentazona (Torstensson i Castillo, 1997)

Uzorak slame, 2g suhe tvari, se dodao u Erlenmayerovu tikvicu do obujma od 100 mL te je u nju dodana otopina A, nakon čega je autoklavirana na 121°C. Jedanaestog dana dodano je 100 µg bentazona po 1 g suhe slame. Kulture su zatim isprane svaki treći dan sterilnim zrakom (Castillo et al., 2000). Mogućnost degradacije također pokazuje mangan peroksidaza enzim koji koristi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> za katalizu oksidacije Mn<sup>2+</sup> do Mn<sup>3+</sup> (Moen i Hammel, 1994). Mn<sup>3+</sup> oksalati difundiraju do područja koje je nedostupno ostalim enzimima.



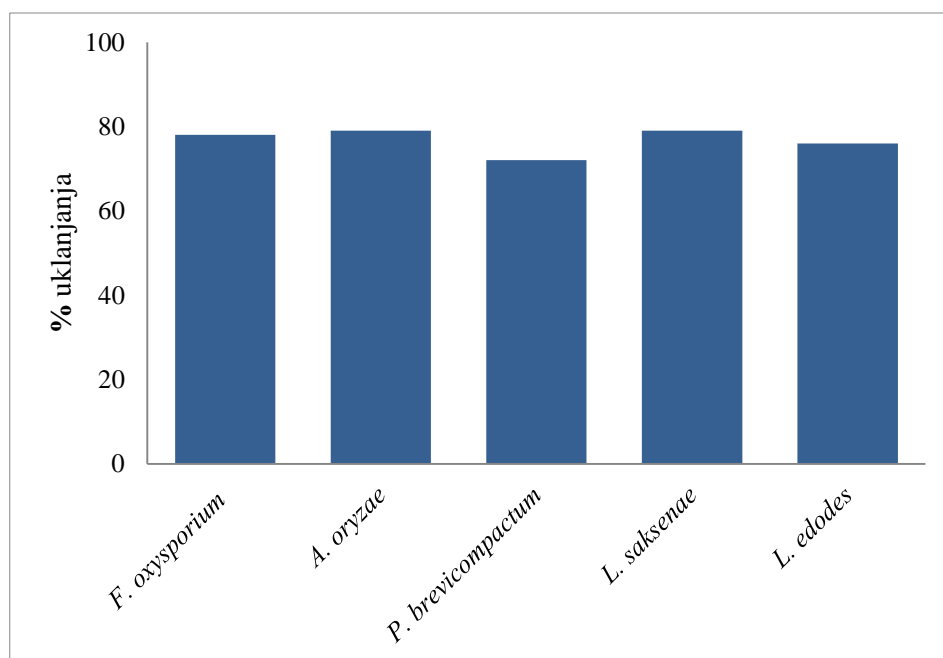
Aktivnost mangan peroksidaze ovisna je o hidrauličkom vremenu zadržavanja i većem broju recirkulacija. Tako se kraćim hidrauličkim vremenom zadržavanja postiže veća aktivnost, dok je kod lignin peroksidaze aktivnost bolja s većim hidrauličkim vremenom zadržavanja. Inhibicija aktivnosti lignin peroksidaze može biti uzrokovana prisutnošću fenola i ekstrakta u slami. Za funkcioniranje potrebna su mu dva metabolita koje gljiva sama proizvodi, to su vodikov peroksid i veratril alkohol, kao posrednici redoks reakcije. Lignin peroksidaza može djelovati na podlogama s visokim redoks potencijalom, te su zbog toga ključni enzimi za razgradnju organskih onečišćenja. Tekući uzorci iz bioreaktora ubrizgani su u HPLC te na taj način analizirani. Gubitak organske tvari određen je vaganjem suhog supstrata prije i nakon ispitivanja (Castillo et al., 2000).

### 3.2 METODE UKLANJANJA TERBUTILAZINA IZ VODE

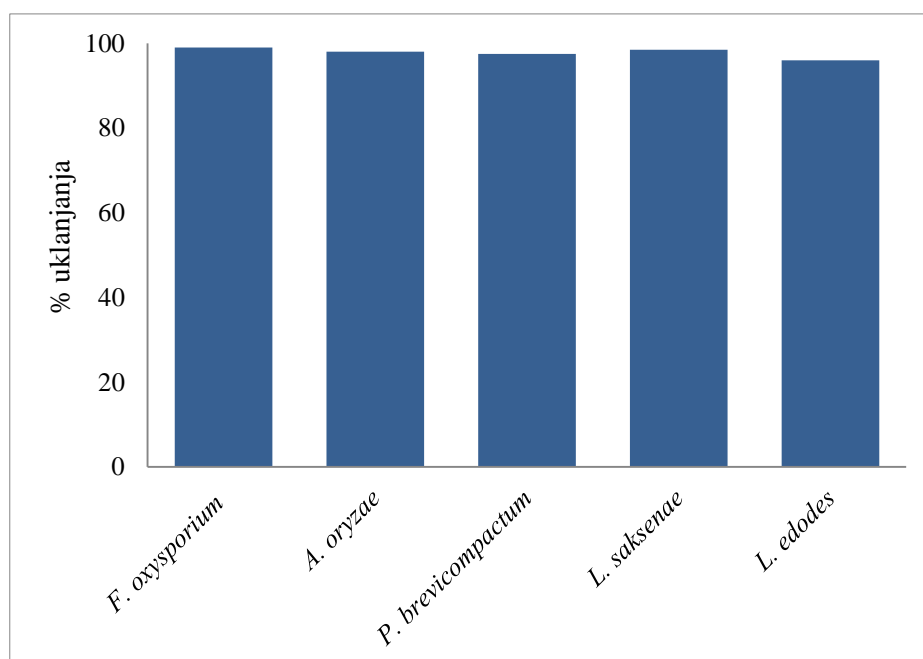
U svom su istraživanju Pinto i suradnici (2012) procijenili sposobnost biorazgradnje pesticida primjenom gljiva *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus oryzae*, *Lentinula edodes*, *Penicillium brevicompactum* i *Lecanicillium saksena*. Biosmjesa koja se sastoji od 10 kg tla te granuliranog pluta, zajedno s populacijom gljiva izoliranom iz ilovače predstavljala je uzorak koji je kontaminiran s pesticidima (terbutilazin i pendimetalin).

Metoda biorazgradnje uz pomoć ovih gljiva pokazala je visoku učinkovitost (slika 3.2.) što je potvrđeno HPLC-UV analizom. *Aspergillus oryzae* postiže 80%-tnu učinkovitost uklanjanja terbutilazina. Glavnu biološku razgradnju postiže *Penicillium brevicompactum*, *Lecanicillium saksena* uklanja 99,5% pendimetalina iz tekućine (slika 3.3.). *Lentinula edodes* pozala se kao gljiva s visokim potencijalom razgradnje pesticida, izričito pendimetalina i difenokonazola (Pinto et al., 2012).

*Betaproteobacteria* može značajno djelovati na razgradnju terbutilazina (Caracciolo et al., 2010). Identifikacijom uz pomoć PCR metode pokazalo se kako dvije vrste *Betaproteobacteria* (*Advenella incenata* i *Janthinobacterium lividum*) mogu razgraditi herbicide. PCR detekcija gena koji kodiraju s-triazin enzimima koji razgrađuju kataboličkom aktivnošću enzima pokazala je prisutnost atzA i atzB gena u *A. incenata* i atzB i atzC geni u *J. lividum*. Eksperiment koji je naveden u literaturi pokazuje razgradnju herbicida mikrobiološkim putem i u sterilnim uvjetima.



**Slika 3.2.** Utjecaj gljiva bijelog truljenja na terbutilazin (Pinto et al., 2012)



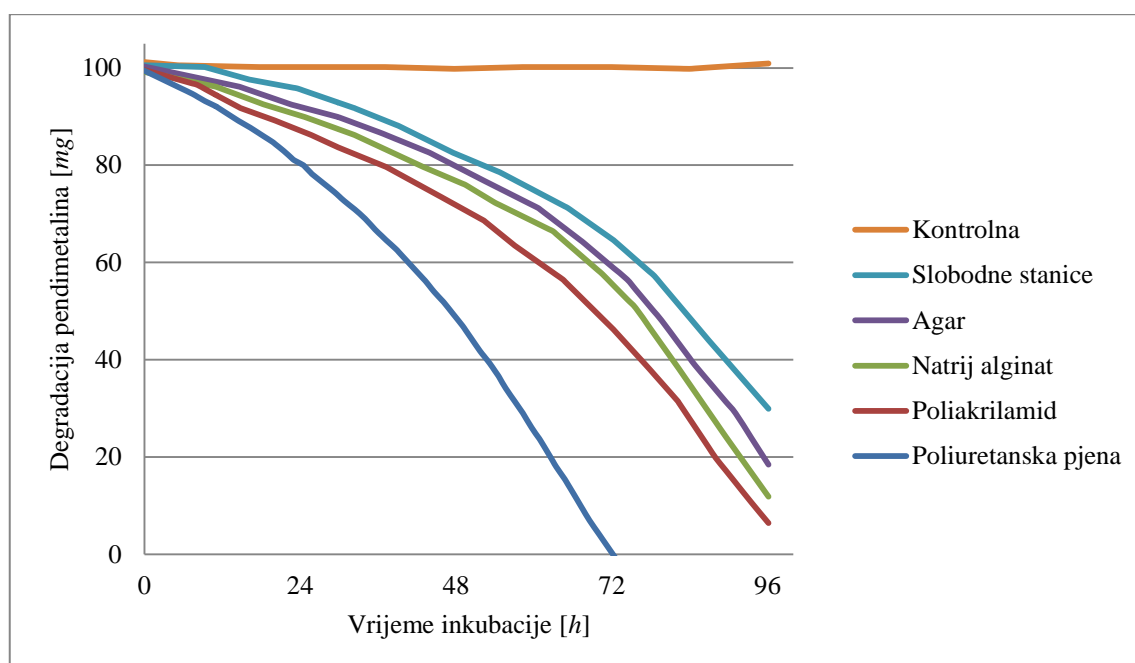
**Slika 3.3.** Utjecaj gljiva bijelog truljenja na pendimetalin (Pinto et al., 2012)

Na temelju rezultata pokazalo se kako je mikrobiološki utjecaj imao veći značaj u razgradnji od podataka dobivenih iz eksperimenta provedenog u sterilnim uvjetima. Inače se terbutilazin pokazao kao iznimno postojan herbicid u podzemnim vodama, njegovo vrijeme poluraspada bilo je u rasponu 263 i 366 dana upravo zbog nedostatka kisika, niske temperature, odsustva svjetla u području gdje su podzemne vode (Navarro et al., 2004).

Također jedna od metoda navedenih u literaturi koja se koristi za razgradnju terbutilazina razvijena je od strane Carraciole i ostalih autora (2004). Cilj ove metode bio je istaknuti ulogu mikroorganizama u razgradnji terbutilazina te utjecaj uree na mikrobnu razgradnju promatranog herbicida. Glavni razgradni produkti koji nastaju zbog prisutnosti uree su hidroksi-terbutilazin koji nastaje dekloriranjem triazinskog prstena i desetil-terbutilazin koji nastaje kada se odcijepe alkilni postranični lanci (Winkelmann i Klaine, 1991). Dakle, primjenom uree smanjila se degradacija terbutilazina te se pokazalo kako tla bez prisustva dušika potiču bolju razgradnju (Gebendinger i Radosevich, 1999).

### 3.3 METODE UKLANJANJA PENDIMETALINA IZ VODE

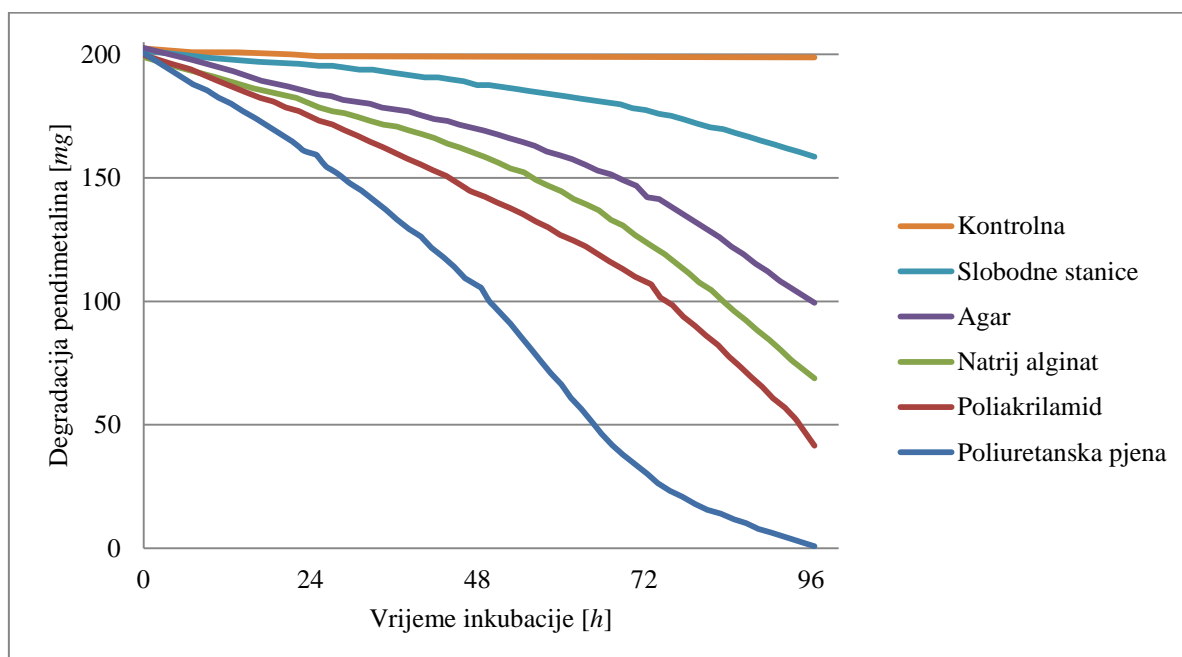
Bakterija koja ima sposobnost razgradnje pendimetalina je izolirana iz uzoraka zagađenog tla te je identificirana kao *Bacillus lehensis* XJU temeljena na 16S rRNA, analizi genetske sekvence (More et al., 2015). Biološka razgradnja pendimetalina slobodno suspendiranih te imobiliziranih stanica *B. lehensis* je istraživana na različitim podlogama kao što su agar, alginat, poliakrilamid i poliuretanske pjena također. Stopa degradacije bila je gotovo ista za slobodne i imobilizirane stanice u agaru i natrij alginatu (engl. *sodium alginate*), dok su u poliakrilamidu (engl. *polyacrylamide*) i poluretanskoj pjeni (engl. *polyurethane foam*) stanice degradirale 93 i 100 za 0,1% pendimetalina nakon 96 i 72 h (slika 3.4.).



**Slika 3.4.** Stopa degradacije pendimetalina (0,1%) u razdoblju 96 h (More et al., 2015)

Na većim koncentracijama, kao što je prikazano slikom 3.5., brzina razgradnje slobodno suspendiranih stanica se smanjila dok su se imobilizirane stanice na poliuretanskoj pjeni potpuno razgradile 0,2% pendimetalina u roku 96 sata. Razgrađena ponovljena smjesa imobiliziranih stanica poliuretanske pjene je ponovno uporabljena za 35 ciklusa bez gubitka 0,1% sposobnosti pendimetalina za razgradnju. Suprotno, agar, alginat i poliakrilamid imobilizirane stanice se mogu ponovno koristiti za 15, 18, i 25 ciklusa.

Kada je koncentracija pendimetalina povećana na 0,2% imobilizirane stanice se mogu ponovno koristiti, ali brzina razgradnje pendimetalina je smanjena.



**Slika 3.5.** Stopa degradacije pendimetalina (0,2%) u razdoblju 96 h (More et al., 2015)

Imobilizirane stanice poliuretanske pjene pokazale su bolju toleranciju na promjenu pH i temperature, nego slobodno suspendirane stanice i mogu se čuvati više od 3 mjeseca bez gubitka sposobnosti pendimetalina za razgradnju. Imobilizacija stanica koje su sposobne razgraditi pendimetalin može poslužiti kao idealna tehnika za potpunu razgradnju herbicida u okolišu (More et al., 2015).

U radu Belal i Mohamed (2013) jedan soj mikroorganizama je izoliran iz tla koje je prethodno tretirano sa pendimetalinom. Pri tome se koristila tehnika obogaćivanja i mikroorganizam je indetificiran je pomoću 16S rDNA kao *Pseudomonas putida* (E15). Provedeno je ispitivanje utjecaja pH i temperature na sposobnost rasta navedenog soja. Rezultati pokazuju da je optimalna temperatura 30°C, a pH 7 za rast soja pendimetalina. *P. putida* je uporabljena da se utvrdi razgradnja pendimetalina iz medija mineralne kapljevine. Poluživot pendimetalina bio je 51,9 dana u neobrađenom tekućem mineralu. *P. putida* i kompost su također evaluirani za detoksikaciju pendimetalina iz glinenog tla. Ocjenjivana je efektivnost *P. putida* i kompost u razgradnji pendimetalina iz tla s poluživotom od 4,67 i 5 dana. U neobrađenom tlu poluživot pendimetalina je 62,43 dana.

Prisutnošću *P. putida* ili komposta u tlu pokazano je ukupno povećanje populacije mikroorganizama. Nije otkrivena toksičnost pendimetalina u tlu biljke krastavca nakon tretmana s *P. putida* ili kompostom. Pendimetalin je značajno smanjio klijanje i povećao smrtnost sadnice krastavaca. *P. putida* i tretman kompostom povećavaju parametre rasta. Štoviše, ne postoji značajna razlika koja je zabilježena u većini rasta parametra između *P. putida* i tretmana kompostom. Abnormalan razvoj ksilema tkiva je uočen u tlu kontaminiranom pendimetalinom uslijed fitotoksičnosti. Rezultati daju naslutiti da se bioremedijacija primjenom *P. putida* i komposta može smatrati efektivnom metodom za uklanjanjem pendimetalina iz tla.

Megadi i suradnici (2009) su bakteriju *Bacillus circulans*, koja ima sposobnost razgradnje pendimetalina, izolirali iz kontaminiranog tla tehnikom obogaćivanja kulture (engl. *enrichment culture technique*). Organizam je rastao na pendimetalinu kao izvoru ugljika te je akumulirao 6-aminopendimetalin i 3,4-dimetil 2,6-dinitroaniline kao metabolite u mediju za kulturu. Stanično slobodni ekstrakt *B. circulans* uzgajan na pendimetalinu sadržavao je aktivnosti pendimetalin nitroreduktaze te pendimetalin mješan funkcijom oksidaze. Rezultati pokazuju da je bakterija razgradila pendimetalin prema nitroredukciji do 6-aminopendimetalina i oksidativnom dealkilacijom na 3,4-dimetil 2,6 dinitroanilin i pentan, koji se koristi kao izvor ugljika i energije za rast.

#### 4. ZAKLJUČAK

Danas je primjena herbicida izrazito važna za zaštitu bilja. Pri tom može imati i negativan utjecaj na okoliš, tako ispiranjem kroz profil tla onečišćuje podzemne vode koje su najvažniji dio globalnog ekosustava. Postoje različite metode pročišćavanja i uklanjanja herbicida, a ovom radu su prikazane različite mikrobiološke te enzimatske metode za uklanjanjem tri herbicida: bentazona, pendimetalina i terbutilazina. Od svih procesa koji utječu na razgradnju herbicida, mikrobiološki imaju najveći značaj. Mikroorganizmi tla, naročito oni iz skupine bakterija, gljiva (gljiva bijelog truljenja *Phanerochaete chrysosporium* ima sposobnost razgradnje većeg broja onečišćujućih tvari u okolišu) i aktinomiceta sposobni su molekule organskih herbicida koristiti kao izvor energije odnosno hrane. U okviru tih procesa, izmjeni se dio ili cijela molekula herbicida te tako ona postane herbicidno inaktivna. Mikrobiološka razgradnja herbicida je ovisna o katalitičkom djelovanju specifičnih enzima proizvedenim od strane mikroorganizama. Mikroorganizmi mogu sadržavati enzime ili ih mogu lučiti u tlo, gdje stupaju u reakciju s molekulama herbicida. Djeluju kao katalizatori u biološkim sustavima, dakle ubrzavaju kemijsku reakciju pri čemu se ne troše niti se mijenjaju.

Kao što je pokazano pregledom literature, brojni su čimbenici koji utječu na brzinu kemijske reakcije primjerice pH, temperatura, koncentracije biokatalizatora te koncentracija herbicida. Ujedno razlike u učinkovitosti primjene pojedine metode uvjetovane su samim tipom metode (enzimatska ili mikrobiološka).



## 5. LITERATURA

1. ANDERSON, T. A., GUTHRIE, E. A., WALTON, B. T., 1993, *Bioremediation in the rhizosphere*, Environmental Science & Technology, Vol. 27(13), str. 2630-2636
2. ASGHER M., BHATTI H. N., ASHRAF M., LEGGE R. L.. 2008, *Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system*, Biodegradation, Vol. 19, str. 771-783.
3. BALIČEVIĆ, R., RAVLIĆ, M., 2014, *Herbicidi u zaštiti bilja*, Poljoprivredni fakultet, Osijek, str. 29-30; 43
4. BARR, D. P., AUST, S. D., 1994, *Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants*, Environmental Science & Technology, Vol. 28(2), str. 79-87
5. BELAL, B. E., MOHAMED, F. E., 2013, *Bioremediation of pendimethalin-contaminated soil*, Academic Journals, African Journal of Microbiology Research, Vol. 7(21), str. 2574-2588
6. BENDING, G. D., M. FRILOUX, M., A. WALKER, A., 2002, *Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential*, FEMS Microbiology Letters, Vol. 212, str. 59-63
7. BOLOGNESI, C., MERLO, F. D., 2011, *Pesticides: Human Health Effects*, In: O. Nriagu Jerome (Ed.): Encyclopedia of Environmental Health. Elsevier, Burlington, str. 438-453
8. CAMERON, M. D., AUST, S. D., 1999, *Degradation of chemicals by reactive radicals produced by cellobiose dehydrogenase from Phanerochaete chrysosporium*, Archives of Biochemistry and Biophysics, Vol. 367, str. 115–21
9. CAMERON, M. D., TIMOFEEVSKI, S., AUST, S. D., 2000, *Enzymology of Phanerochaete chrysosporium with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics*, Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 54, str. 751–758
10. CARACCIOLO, A. B., FAJARDO, C., GRENNI, P., SACCA, M. L., AMALFITANO, S., CICCOLI, R., MARTIN, M., GIBELLO, A., 2010, *The role of a groundwater bacterial community in the degradation of the herbicide terbutylazine*, FEMS Microbiology Ecology, Vol. 71(1), str. 127-136
11. CARRACCIOLO, A. B., GIULIANO, G., GRENNI, P., CREMISINI, C., CICCOLI, R., UBALDI, C., 2004, *Effect of urea on degradation of terbutylazine in soil*, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 24(5), str. 37-42

12. CASTILLO, M. D., ANDER, P., STENSTRÖM, J., TORSTENSSON, L., 2000, *Degradation of the herbicide bentazon as related to enzyme production by Phanerochaete chrysosporium in two solid substrate fermentation systems*, World Journal of Microbiology & Biotechnology, Vol. 16, str. 289-295
13. CASTILLO, M. D., ANDERSSON, A., ANDER, P., STENSTRÖM, J., TORSTENSSON, L., 2001, *Establishment of the white rot fungi Phanerochaete chrysosporium on unsterile straw in solid substrate fermentation systems intended for degradation of pesticides*, World Journal of Microbiology & Biotechnology, Vol. 17, str. 627-633
14. CHAMBON, P., 1998, *Terbuthylazine (TBA) in Drinking-water*, World Health Organization, Geneva
15. CURL, E. A., TRUELOVE, B., 1986, *The Rhizosphere*, Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg, str. 1-288
16. CURTIS D., 2001, *Klaassen, Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*, McGraw Hill, 6. izd.
17. CYCOÑA, M., WÓJCIK, M., PIOTROWSKA-SEGETC, Z., 2009, *Biodegradation of the organophosphorus insecticide diazinon by Serratia sp. and Pseudomonas sp. and their use in bioremediation of contaminated soil*, Chemosphere, Vol. 76, str. 494-501
18. DE WILDE, T., SPANOGHE, P., MERTENS, J., SNIEGOWSKI, K., RYCKEBOER, J., JAEKEN, P., SPRINGAEL, D., SPANOGHE, P., 2009, *Characterizing pesticide sorption and degradation in micro scale biopurification systems using column displacement experiments*, Environmental pollution, Vol. 157, str. 463–473
19. DRAUZ, K., 2012, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Wiley-VCH, Weinheim, str. 4-12
20. DUKE, S. O., 1988, *Glyphosate, Herbicides: Chemistry degradation and mode of action* (P. C. Kearney and D. D. Kaufman, Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, Vol. 3, str. 1-70
21. DUKE, S. O., KENYON, W. H., 1988, *Polycyclic alkanoic acids, Herbicides: Chemistry degradation and mode of action*, (P. C. Kearney and D. D. Kaufman, Eds.), Marcel Dekker, New York, Vol. 3, str. 71-116

22. DURÁN, N., 1997a, *Oxidative enzymes applied to bioremediation*, Proceedings of the first National Meeting of Environmental Applied Microbiology, Vol. 1, Campinas, S. P., Brazil. str. 183., Chemical Abstracts 127, 310976
23. DURÁN, N., 1997b, The impact of biotechnology in the pulp and paper industry: state of art, in: M. T. Martins, et. al. (eds), *Progress in Ecology*, Society of Brasil Microbiology/ICOME Publishers, S. P. Brazil, str. 543
24. DWIVEDI S, SINGH B. R., AL-KHEDHAIRY A. A., MUSARRAT J.. 2011, *Biodegradation of isoproturon using a novel Pseudomonas aeruginosa strain JS-11 as a multi-functional bioinoculant of environmental significance*, Journal of. Hazardous Materials, Vol. 185(23), str. 3938-3944
25. ĐOKIĆ, M., BILANDŽIĆ, N., BRIŠKI, F., 2012, *Postupci uklanjanja pesticida iz okoliša*, Kemija u Industriji, Vol. 61(7-8), str. 341–348
26. EFSA, , 2011, *Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance terbuthylazine*, EFSA Journal, Vol. 9, str. 1–133.
27. FABER K., 2011, *Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 5. izd., str. 3-9; 12-14; 21; 177
28. FRAZAR, C., 2000, *The Bioremediation and Phytoremediation of Pesticide-contaminated Sites*, U.S. Environmental Protection Agency, Washington
29. FRAZZETTO, G., 2003, *White Biotechnology*, EMBO Reports, Vol. 4, str. 835-837
30. GADD, G. M., 2001, *Fungi in bioremediation*, The Press Syndicate of the University of Cambridge, Cambridge, str. 52-79
31. GARBISU, C., HERNANDEZ-ALLICA, J., BARRUTIA, O., ALKORTA, I., BECERRIL, J. M., 2002, *Phytoremediation: a technology using green plants to remove contaminants from polluted areas*, Reviews on Environmental Health, Vol. 17(3), str. 173–188
32. GEBENDINGER, N., RADOSEVICH, M., 1999, *Inhibition of atrazine degradation by cyanazine and exogenous nitrogen in bacterial isolate M91-3*, Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 51, str. 375-381
33. GIANFREDA, L., RAO, M. A., 2004, *Potential of extra enzymes in remediation of polluted soils: a review*, Enzyme and Microbial Technology, Vol. 35(4), str. 339-354
34. GIORNO, L., DRIOLI, E., 2000, *Biocatalytic membrane reactors: applications and perspectives*, Trends in Biotechnology, Vol. 18, str. 339-349

35. GORBATOVA, O. N., KOROLEVA, O. V., LANDESMAN, E. O., STEPANOVA, E. V., ZHERDEV, A. V., 2006, *Increase of the detoxification potential of Basidiomycetes by induction of laccase biosynthesis*, Applied Biochemistry and Microbiology, Vol. 42(4), str. 414-419
36. GRAMMS, G., VOIGT, K. D., KIRSCHKE, B., 1999, *Oxidoreductase enzymes liberated by plant roots and their effects on soil humic material*, Chemosphere, Vol. 38, str. 1481-1494
37. GUIMONT, S., PERRIN-GANIER, C., REAL, B., SCHIAVON, M., 2005, *Effects of soil moisture and treatment volume on bentazon mobility in soil*, Agronomy for Sustainable Development, Vol. 25, str. 323–329
38. GÜNTHER, T., KIRSCHKE, B., FRITSCHKE, W., 2000, *Potential of plant–microbe- interactions for in situ bioremediation of hydrocarboncontaminated soils*, u D. L. Wise, D. J. Trantolo, E. J. Cichon, H. I. Inyang, U. Stottmeister (ur.), Bioremediation of Contaminated Soils, Marcel Dekker, New York – Basel, str. 285–293
39. HEINFLING A., BERGBAUER M., SZEWZYK U., 1997, *Biodegradation of azo and phthalocyanine dyes by Trametes versicolor and Bjerkandera adusta*, Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 48, str. 261-266
40. HOEKS, F. W. J. M. M., BÖHLEN, E., DE RIEDMATHEN, P., GLÖCKLER, R., KIENER, A., MEYER, H. P., ROHNER, M., SCHMIDHALTER, D., ZIMMERMANN, B., 1995, *Process integration aspects for the production of fine chemicals by biotransformations*, Proc. ECB7, Nice, France
41. HORNSBY, A.G., WAUCHOPE, R.D., HERNER, A.E., 1996., *Pesticide properties in the environment*, Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, str. 1-227
42. HUMMEL, W., 1999, *Large-scale applications of NAD(P)-dependent oxidoreductases: recent developments*, Trends in Biotechnology, Vol. 17, str. 489-491
43. JAUREGUI, J., VALDERRAMA, B., ALBORES, A., VAZQUEZ-DUHALT, R., 2003, *Microsomal transformation of organophosphorus pesticides by white rot fungi*, Biodegradation, Vol. 14, str. 397-406
44. KARAM, J., NICELL, J. A., 1997, *Potential applications of enzymes in waste treatment*, Journal of Chemical Technology & Biotechnology, Vol. 67, str. 141

45. KIM, J. E., WANG, C. J., BOLLAG, J. M., 1998, *Interaction of reactive and inert chemicals in the presence of oxidoreductases: Reaction of the herbicide bentazon and its metabolites with humic monomers*, Biodegradation, Vol. 8, str. 387-392
46. KIRK, O., BORCHERT, T. V., FUGLSANG, C. C., 2002, *Industrial enzyme applications*, Current Opinion in Biotechnology, Vol. 13, str. 345-351
47. KIRK, T. K ; TIEN , M., 1998, *Lignin Peroxidase of Phanerochaete chrysosporium*, Academic Press, Vol. 161, str. 238-249
48. KNAUBER, W. R., KROTZKY, A. J., SCHINK, B., 2000, *Microbial metabolism and further fate of bentazon in soil*, Environmental Science & Technology, Vol. 34, str. 598–603
49. KOJIĆ, M., STANKOVIĆ, A., ČANAK, M., 1972, *Korovi – biologija i suzbijanje*, Institut za zaštitu bilja, Novi Sad
50. KRIEGER, R., 2001, *Handbook of Pesticide Toxicology*, Academic Press, Vol. 1(2), str. 707–725
51. KUBIAK, R., COUSINS, I., HOURDAKIS, A., 2008, *Pesticides in air: Considerations for exposure assesment*, FOCUS, EU, SANCO/10553/2006
52. LI, K. B., CHENG, J. T., WANG, X. F., ZHOU, Y., LIU, W. P., 2008. *Degradation of herbicides atrazine and bentazone applied alone and in combination in soils*, Pedosphere, Vol. 18(2), str. 265-272
53. MACIEL G. M., BRACHT A., SOUZA C. G. M., COSTA A. M., PERALTA R. M., 2013, *Fundamentals, diversity and application of white-rot fungi*, In: Silva AP, Sol M (Eds) *Fungi: types, environmental impact and role in disease*, Nova Science Publishers, str. 409-458
54. MANSEE, A. H., CHEN, W., MULCHANDANI, A., 2005, *Detoxification of the organophosphate nerve agent coumaphos using organophosphorus hydrolase immobilized on cellulose materials*, Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, Vol. 32, str. 554-560
55. MARCOS-URREA E., REDDY C. A., 2012, *Degradation of chloro-organic pollutant sw by white rot fungi*, In: Sing SN (Ed) *Microbial degradation of xenobiotics*, Springer Berlin Heidelberg, str. 31-66
56. MAY, W., 1999, *Applications of oxidoreductase*, Current Opinion in Biotechnology, Vol. 10, str. 370-375

57. MEGADI, V. B., TALLUR, P. N., HOSKERI, R. S., MULLA, S. I., NINNEKAR, H. Z., 2009, *Biodegradation of pendimethalin by Bacillus circulans*, Indian Journal of Biotechnology, Vol. 9, str. 173-177
58. MEGHARAJ, M., RAMAKRISHNAN, B., VENKATESWARLU, K., SETHUNATHAN, N., NAIDU, R., 2011, *Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective*, Environment International, Vol. 37(8), str. 1362-1375
59. MEULENBERG, R., RIJNAARTS, H. H. M., DODDEMA, H. J., FIELD, J. A., 1997, *Partially oxidized polycyclic aromatic hydrocarbons show an increased bioavailability and biodegradability*, FEMS Microbiology Letters, Vol. 152(1), str. 45-49
60. MOEN, M. A., HAMMEL, K. E., 1994, *Lipid peroxidation by the manganese peroxidase of Phanerochaete chrysosporium is the basis for phenanthrene oxidation by the intact fungus*, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 60, str. 1956-1961
61. MOHAN, S. V., KRISHNA, M. R., MURALIKRISHNA, P., SHAILAJA, S., SARMA, P. N., 2007, *Solid phase bioremediation of pendimethalin in contaminated soil and evaluation of leaching potential*, Bioresource Technology, Vol. 98, str. 2905-2910
62. MORE, V. S., TALLUR, P. N., NIYONZIMA, F. N., MORE, S. S., 2015, *Enhanced degradation of pendimethalin by immobilized cells of Bacillus lehensis XJU*, 3 Biotech, str. 1-8
63. NAVARRO, S., VELA, N., GIMENEZ, M. J., NAVARRO, G., 2004, *Effect of temperature on the disappearance of four triazine herbicides in environmental waters*, Chemosphere, Vol. 57, str. 51-59
64. NEVADO, J. J. B., CABANILLAS, C. G., LLERENA, M. J. V., ROBLEDO, V. R., 2007, *Sensitive SPE GC-MS-SIM screening of endocrine-disrupting herbicides and related degradation products in natural surface waters and robustness study*, Microchemical Journal, Vol. 87(1), str. 62-71
65. OERKE, E. C., 2006, *Crop losses to pests*, The Journal of Agricultural Science, Vol. 144(1), str. 31-43
66. OKPOKWASILI, G. C., NWEKE, C. O., 2005, *Microbial growth and substrate utilization kinetics*, African Journal of Biotechnology, Vol. 5(4), str. 305-317

67. OSTOJIĆ Z., 1987, *Osvrt na sadašnje stanje primjene herbicida u ratarskim kulturama*, Poljoprivredne aktualnosti, Vol. 3-4, str. 685-695
68. OSTOJIĆ. Z., 2003a, *Mogu li ostatci atrazina štetiti idućim kulturama*, Gospodarski list, Vol. 161(22), str. 47-48
69. OSTOJIĆ, Z., 2003b, *Sredstva za zaštitu bilja i vode*, Glasilo biljne zaštite, Sažeci 47. Seminara biljne zaštite, str. 9-11
70. PASZCZYNSKI, A., CRAWFORD, R. L., 1995, *Potential for Bioremediation of Xenobiotic Compounds by the White-Rot Fungus Phanerochaete chrysosporium*, Biotechnology Progress, Vol. 11, str. 368-379
71. PEČEK, G., MUTAVDŽIĆ-PAVLOVIĆ, D., BABIĆ, S., 2012, *Development and validation of SPE-GC-MS method for the determination of pesticides in surface water*, International Journal of Environmental Analytical Chemistry, Vol. 93(12), str. 1311-1328
72. PINTO, A. P., SERRANO, C., PIRES, T., MESTRINHO, E., DIAS, L., MARTINS TEIXEIRA, D., CALDEIRA, A. T., 2012, *Degradation of terbutylazine, difenoconazole and pendimethalin pesticides by selected fungi cultures*, Science of the Total Environment, str. 435-436; 402-410
73. PIOTROWICZ-CIEŚLAK, A. J., ADOMAS, B., 2012, *Herbicide Phytotoxicity and Resistance in Legum Plant*, U: Herbicides- Environmental Impact Studies and Management Approaches, Alvarez-Fernandez, R. (Ed.), InTech, str. 19-44
74. POINTING, S. B., 2001, *Feasibility of bioremediation by white-rot fungi*, Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 57, str. 20–32
75. QUINTERO, J. C., MOREIRA, M. T., LEMA, J. M., FEIJOO, G., 2006, *An anaerobic bioreactor allows the efficient degradation of HCH isomers in soil slurry*, Chemosphere, Vol. 63, str. 1005–1013
76. RANDALL, J. M., 1996, *Weed control for the preservation of biological diversity*, Weed Technology, Vol. 10, str. 370-383
77. REDDY, C. A., 1995, *The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants*, Current Opinion in Biotechnology, Vol. 6, str. 320–328
78. RIDLEY, S. M., 1982, *Carotenoids and herbicide action*, IUPAC Carotenoid Chemistry and Biochemistry (G. Britton and T. W. Goodwin,Eds.), Pergamon Press, Oxford, str. 353-369
79. ROCA, E., D'ERRICO. E., IZZO, A., STRUMIA, S., ESPOSITO, A., FIORENTINO, A., 2009, *In vitro saprotrophic basidiomycetes tolerance to*

- pendimethalin*, International Biodeterioration & Biodegradation, Vol. 63, str. 182–186
80. SALT, D. E., BLAYLOCK, M., KUMAR, N., DUSHENKOV, V., ENSLEY, B. D., CHET, I., RASKIN, I., 1995, *Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants*, Biotechnology, Vol. 13, str. 468–474
  81. SARIASLANI, F. S., ROSAZZA, J. P. N., 1984, *Biocatalysis in natural products chemistry*, Enzyme and Microbial Technology, Vol. 6, str. 242-253
  82. SCHMID, A., DORDICK, J. S., HAUER, B., KIENER, A., WUBBOLTS M., WITHOLT B., 2001, *Industrial biocatalysis today and tomorrow*, Nature, Vol. 409, str. 256-268
  83. SCHULZE, L. D., OGG, C. L., VITZTHUM, E. F., 1997, *Signs and Symptoms of Pesticide Poisoning*, University of Nebraska, Nebraska, EC97-2505-A
  84. SILVA COELHO MOREIRA, J., MACIEL, G. M., CASTOLDI, R., SILVA MARIANO, S., INACIO, F. D., BRACHT, A., PERALTA, R. M., 2013, *Involvement of Lignin- Modifying Enzymes in the Degradation of Herbicides*, Herbicides- Advances in Research, str. 165-187
  85. SIMUNEK, J., VAN GENUCHTEN, M. TH., SEJNA, M., 2005, *The HYDRUS-1D Software Package for Simulating the Movement of Water, Heat and Multiple Solutes in Variably Saturated Media*, Version 3.0, HYDRUS Software Series 1. Department of Environmental Sciences, University of California Riverside, Riverside, California
  86. SMITH, A. E., AUBIN, A. J., MCINTOSH, T. C., 1995, *Field persistence studies with emulsifiable concentrate and granular formulations of the herbicide pendimethalin in Saskatchewan*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 43, str. 2988-2991
  87. ŠAŠEK, V., 2003, *The utilization of bioremediation to reduce soil contamination: problems and solution*, The NATO Science Series VI, Prag, Vol. 19, str. 247-266
  88. TOMLIN, C. D. S., 2011, *The pesticide manual*, 15. ed., Surrey, British Crop Protection Council
  89. TORTENSSON, L., CASTILLO, M. D. P., 1997, *Use of biobeds in Sweden to minimize environmental spillages from agricultural spraying equipment*, Pesticide Outlook, Vol. 8, str. 24-27



90. TREBST, A., 1987, *The three-dimensional structure of the herbicide binding niches on the reaction center polypeptides of photosystem II*, Zeitschrift für Naturforsch, Vol. 42C, str. 742-750
91. TYCHANOWICZ, G. K., ZILLY, A., SOUZA, C. G. M., PERALTA, R. M., 2004, Decolorization of industrial dyes by solid-state cultures of *Pleurotus pulmonarius*, Process Biochemistry, Vol. 39, str. 855–859
92. VASIĆ-RAČKI, Đ., WICHMANN, R., 2005, *Cofactor Regeneration at the Lab Scale*, Advantages in Biochemical Engineering/Biotechnology, ur. U. Kragl, Springer Verlag Heidelberg, Vol. 92, str. 225-260
93. VINCEKOVIĆ, M., 2004, *Herbicidni učinak glifosata na genetički modificirani hibrid kukuruza DK493RR i posljedice koje uzrokuje RR gen u poljskim uvjetima*, Croatian scientific Bibliography, BRN: 227014
94. VON SPERLING, M., ANDREOLI, C. V., FERNANDES, F., 2007, *Sludge Treatment and Disposal*, IWA Publishing, London, Vol. 6
95. WANG, S., ZHAO, P., MIN, G., FANG, G, 2007, *Multi-residue determination of pesticides in water using multi-walled carbon nanotubes solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry*, Journal of Chromatography A , Vol. 1165(1-2), str. 166-171
96. WESENBERG, D., KYRIAKIDES, I., AGATHOS, S. N., 2003, *White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents*, Biotechnology Advances , Vol. 22, str. 161-187
97. WILKINSON, R. E., 1988, *Carbamothioates*. Herbicides-Chemistry, Degradation, and Mode of Action, (P. C. Kearney and D.D. Kaufman, Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, Vol. 3, str. 245-300
98. WINKELMANN, D. A., KLAINE, S. J. D., 1991, *Degradation and bound residues formation of four atrazine metabolites, deethylatrazine, deisopropylatrazine, dealkylatrazine, and hydroxyatrazine in a western Tennessee soil*, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 10, str. 347–354
99. YANDOC-ABLES, C.B., ROSSKOPF, E. N., CHARUDATTAN, R., 2006, *Plant Pathogens at Work: Progress and Possibilities for Weed Biocontrol*, Part 1: Classical vs. Bioherbicidal Approach, Online, APSnet Features.
100. ZAKS, A., 2001, *Industrial biocatalysis*, Current Opinion in Chemical Biology, Vol. 5, str. 130-136

101. ZHANG, C., HUGHES, J. B., NISHINO, S. F., SPAIN, J., 2000, *Slurry-phase biological treatment of 2,4- dinitrotoulene and 2,6-dinitrotoulene: role of bioaugmentation and effects of high dinitrotoulene concentrations*, Environmental Science & Technology, Vol. 34, str. 2810-2816

#### WEB IZVORI:

1. URL: [http://www.agf.gov.bc.ca/pesticides/b\\_2.htm](http://www.agf.gov.bc.ca/pesticides/b_2.htm) , *pristup: 29.8.2015*
2. URL: [https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Phanerochaete\\_chrysosporium](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Phanerochaete_chrysosporium),  
*pristup: 29.8. 2015*
3. URL: [http://www.syngenta.com/country/hr/cr/Syngentin\\_program/Sredstva\\_za\\_zastitu\\_bilja/Herbicidi/Pages/home.aspx](http://www.syngenta.com/country/hr/cr/Syngentin_program/Sredstva_za_zastitu_bilja/Herbicidi/Pages/home.aspx), *pristup: 17.07.20015*
4. URL: [http://pinova.hr/hr\\_HR/katalog-proizvoda/sredstva-za-zastitu-bilja/ herbicidi](http://pinova.hr/hr_HR/katalog-proizvoda/sredstva-za-zastitu-bilja/herbicidi),  
*pristup: 17.07.20015*

## **ŽIVOTOPIS**

Kata Šipić je rođena 17. prosinca 1992. u Kaknju (BiH). Osnovnu školu je završila u Drvaru, nakon čega je upisala Opću gimnaziju Družbe sestara milosrdnica s pravom javnosti u Zagrebu. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, smjer Ekoinženjerstvo, upisala je 2011. godine u Zagrebu. Tijekom preddiplomskog studija obavljala je demonstrature iz kolegija Mikrobiologija i Zaštita okoliša na Zavodu za Industrijsku ekologiju.